

Міністерство освіти і науки України
Дніпровський державний технічний університет

І. М. Корнієнко

конспект лекцій

з дисципліни

**«БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ
КЛІТИН»**

для здобувачів вищої освіти за освітньо- професійною
програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності
162 БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ

Затверджено:

Редакційно-видавничою секцією
науково-методичної ради ДДТУ
25.09.2017 р.(протокол № 7)

Кам'янське
2017

Конспект лекцій з дисципліни “ Біотехнологія рослинних і тваринних клітин”. Для здобувачів другого магістреського рівня зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, Укладачі:

Корнієнко І. М. Кам’янське: ДДТУ, 2017. – 133с.

Укладачі: Корнієнко І. М.

Відповідальний за

випуск:

зав. кафедри ПБЗХ,

доцент,

Корнієнко І.М.

Рецензент:

доцент, к. т. н., доц. Анацький А.С.

Затверджено на засіданні кафедри ПБЗХ

(протокол № 10

від 22.09. 2017р.)

Конспект лекцій – складова частина навчального процесу підготовки фахівців освітньо-кваліфікаційного рівня. Конспект лекцій повністю відповідає робочій програмі підготовки здобувачів другого магістреського рівня. В конспекті розкрито основні підходи та методи культивування рослинних і тваринних клітин.

ЗМІСТ

1. Тема 1. Будова еукаріотних клітин
2. (тваринна клітина і рослина клітина). Роль культури ізолюваних рослинних клітин в біотехнології
3. 1.1.Предмет цитології.
4. 1.2. Мета та задачі вивчення дисципліни.....
5. 1.3.Основні напрямки біотехнології рослинних клітин.
.....
6. 1.4.Етапи та історія розвитку отримання каллусів.
- 1.5.Етапи та історія розвитку каллусів.....
7. 2. Тема 2. Основні етапи отримання
8. культур каллусних клітин
9. 2.1.Загальна характеристика каллусних
10. тканин.
11. 2.2.Визначення умов
12. дедиференцировки рослинних
13. клітин.....
14. 2.3.Особливості росту каллусних
15. клітин.
16. 2.4.Генетика каллусів.....
17. 2.5.Умови культивування.....
18. 2.6.Культура каллусних тканин.....
19. 2.7Особливості каллусних кліток.....
20. 2.8.Роль гормонів на стадіях отримання.....
21. каллусів.....
22. 2.9. Культура клітинних суспензій.....
23. 2.10.Типи розвитку каллусів за морфогенезом (ембріогенез та органогенез).....
24. 2.11.Культура одиночних клітин
25. (метод «Няньки»).
26. 2.12.Використання каллусів в
27. отримання вторинних метаболітів.....
28. 3.Тема 3 . Клональне мікророзмноження рослин
- 29.
30. 3.1.Основні етапи та методи
31. клонального мікророзмноження рослин.....

32.	3.2. Методи оздоровлення посадочного матеріалу.....
33.	3.3. Основні вимоги до техніки культивування
34.	рослинних клітин під час мікроклонального
35.	розмноження.
36.	3.4. Оптимізація мікроклонального розмноження
37.	рослин.
38.	3.5. Визначення впливу та вироботки керуючої дії
39.	на систему впливаючих факторів різної природи при
	мікроклональному розмноженні.....
40.	3.6. Культура одиночних клітин
41.	(«метод Няньки»).
42.	3.7. Морфогенез в калусних тканинах
43.	4. Тема 4. Генна інженерія рослин
44.	4.1. Традиційні методи селекції.....
45.	4.2. Проміжний і бінарний вектори.....
46.	4.3 Вектори на основі ДНК
	вірусів.....
47.	4.4. Використання хлоропластної і мітохондріальної
	
48.	4.5. ДНК рослин для створення човникових векторів.....
49.	4.6. Методи прямого перенесення генів в рослину.....
50.	4.7. Трансформація рослинних протопластів.....
51.	4.8. Поліпшення якості зерна методами генної
	інженерії.....
52.	4.9. Отримання трансгенних рослин стійких до
53.	стресових дій.
54.	4.10. Отримання трансгенних рослин стійких до
	комах.....
55.	5. Тема 5. Перспективи біотехнології культур клітин
	тварин - 4 год.
56.	5.1. Історія використання крупномасштабних культур
	клітин тварин. Гомони та фактори росту.....
57.	5.2. Генна інженерія в тваринництві.....
58.	5.3. Введення кліток в культуру, їх походження.....
59.	5.4. Характеристика кліток, культивованих in vitro.....
60.	6. Тема 6. Отримання та використання лімфоцитних
	гібридом

61.	6.1.Сутність процесу.....
62.	6.2.Сутність методів імунізації.....
63.	6.3.Культивування гібридом.....
64.	6.4. Злиття партнерів. Гібридизація.....
65.	6.5.Культивування гібридом.
66.	6.6.Застосування моноклональних антитіл.....
67.	7.Тема 7. Фракціонування вірусів і готування субодиничних вакцин.
68.	7.1.Характеристика вакцин.....
69.	7.2. Методи фракціонування.....
70.	7.3. Солюбілізація.....
71.	7.3Сепарація.
72.	7.4.Очищення.
73.	7.5.Застосування.
74.	7.6. Протигрипозна вакцина.
75.	7.7.Віруси парагриппу й кору.
76.	7.8.Віруси сказу й везикулярного стоматиту.
77.	7.9.Вірус герпес-симплекс.
78.	7.10.Інші герпес-віруси.....
79.	7.11 Вірус лісу Семліки.
80.	7.12Вірус краснухи.
81.	7.13Аденовірус.....
82.	7.13 Переваги субодиничних вакцин.....
83.	7.14 Ефективність.....
84.	8. Тема 8. Промислове культивування тваринних клітин
85.	8.1.Живильні середовища і умови культивування.....
86.	8.2. Системи культивування кліток.....
87.	8.3.Промислове культивування тваринних клітин.....
88.	8.4.Будування процесів культивування з урахуванням біологічних аспектів.....
89.	8.5.Типи конструкції біореакторів для культивування тваринних клітин..
90.	8.6.Безперервно-проточне культивування клітин тварин.
91.	8.7.Циклічна культура з підживленням середовища.
8.8	Безперервно-проточна культура.....
92.	8.9.Культивування клітин тварин в безперервно-проточній системі.....

- 93. 8.10 Отримання клітин в хемостаті.....
- 94. 8.11 Виробництво клітинних продуктів в хемостаті.....
- 95. 8.12 Виробництво вірусів в хемостате.....
- 96. 8.13 Виробництво інтерферону в хемостаті.....
- 97. 8.14 Перспективи застосування безперервно-проточного культивування клітин тварин.....

ВСТУП

Метою викладання дисципліни є формування теоретичних, практичних засад і принципів направлених на визначення основних біотехнологічних напрямків використання рослинних і тваринних клітин в отриманні високої якості вторинних метаболітів необхідних для суспільства при вирішенні основних проблем шляхом удосконалення, інтенсифікації та оптимізації технології культивування клітин в біореакторах.

Освоєння дисципліни відкриє студентам нові перспективні напрямки отримання таких необхідних продуктів - вторинних метаболітів - рослинних клітин, як калусних культур, котрі широко використовуються в медицині, парфумерії, косметичі та сільському господарстві. Сучасні методи культивування тваринних клітин дозволяють отримати необхідної якості протиракові вакцини, імунорегуляторні матеріали, моноклональні антитіла, інсектициди, ферменти, гормони і вирішити проблеми зоології та ветеринарної медицини.

ТЕМА 1. Будова еукаріотних клітин (тваринна клітина і рослина клітина). Роль культури ізольованих рослинних клітин в БТ

1.1.Предмет цитології

Найхарактерніша властивість живих організмів - це їх складність і високий рівень організації. У живих організмів дуже ускладнена внутрішня структура і вони містять у собі значну кількість хімічних сполук різної будови.

Важливою особливістю живого є його здатність акумулювати з навколишнього середовища та перетворювати енергію, яка витрачається на будову і підтримку характерної для живого структурної організації.

Основна властивість організму – здатність до точного самовідтворення, що є найголовнішою властивістю життя.

Універсальним і найдрібнішим осередком життя є клітина. Клітинні структури властиві бактерія, грибам, рослинам, тваринам і людині. Це підкреслює їх спільність та органічну єдність у царстві природи. У клітині сконцентровано усі життєво важливі процеси, насамперед, здатність до росту й розмноженню. Клітини це структурні та функціональні одиниці всіх живих організмів.

Цитологія (від лат. Cytus- клітина, logos- вчення) – наука, що вивчає будову і функції клітин організмів.

Усім клітинам притаманні властивості:

1. Будь-яка клітина оточена мембраною, що відділяє її від зовнішнього світу. Мембрана має вибіркиму проникність – надходження в клітину і виділення з неї метаболітів та іонів під постійним контролем мембранних систем.

2. Клітина – досконала біоенергетична система, яка продукує енергію для власних потреб.

3. Клітина - могутня інформаційна система, з якої не можуть змагатися найсучасніші ЕОМ. Ця система працює за єдиною, згодженою програмою, в якій усі процеси взаємозалежні. Головна інформація зосереджена в ядрі і локалізована структури гігантських молекул ДНК. Розшифрування цієї інформації відбувається швидко за участю білків.

4. У клітині щосекунди відбуваються тисячі перетворень, в яких усі процеси повністю скоординовані, скооперовані і ґрунтуються на безвідходній технології.

5. Клітина - складний лабіринт структур, сполучених сіткою переходів, каналців, по яких безупинно рухаються продукти перетворень і синтезів.

Вивчення клітини має велике значення для наукового прогресу в тих галузях, що пов'язані із сучасною біологією та біотехнологією.

Процеси і закономірності, що вивчає цитологія, лежать в основі процесів, які є предметом гістології, анатомії, ембріології, біохімії, молекулярної біології.

Вперше будову клітини вивчав у 1665 році Роберт Гук.

Найменшою життєздатною одиницею живого є клітина. Основні хімічні компоненти клітини: нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи, фосфоліпіди. Еукаріотні клітини можуть існувати самостійно, як окремі організми (найпростіші, водорості, гриби), так і в складі тканин багатоклітинних організмів (тварин, рослин, грибів).

Діаметр клітин еукаріотів коливається в межах 10-100 мкм. Основним компонентом ядра клітин є ДНК у вигляді гігантських молекул. Молекули мають лінійну будову і знаходяться в комплексі з спеціальними білками – гістонами. Вони є основою будови хромосоми. Хромосоми складаються з ниток. В склад ниток входять довгі молекули складного органічної речовини – ДНК, яка знаходиться в складі з білком. В молекулі ДНК за допомогою деяких груп записується інформація та програма розвитку клітини і самого організму. Самі хромосоми приймають участь у регуляції життєдіяльності клітини. В клітинах людини є 46 хромосом, в клітині голуба – 80 хромосом. Для еукаріотних клітин (рис. 1) характерна наявність ядерної оболонки, що складається з двох ліпопротеїдних мембран, між якими розміщений перинуклеарний простір до 20 нм. Внутрішня частина ядра заповнена рідиною – каріоплазмою, що містить хроматин – компонент хромосоми.

В інтерфазному ядрі (період між поділами) важливу роль відіграють ядерця – специфічні ділянки хромосом, що синтезують рибосомні РНК і здійснюють збирання попередників рибосомних субодиниць. Ядро – це коловидне тіло, яке займає 1/5 частину усієї клітини. Воно виконує функції центру, який керує життєдіяльністю

клітини. В ядрі є ядерця, які формуються деякими ділянками хромосом – ядерними організаторами. В них відбувається утворення рибосом – спеціальних структур, необхідних для синтезу білків. Ядро відділяється від цитоплазми оболонкою – ядерною мембраною.

Ядро оточене цитоплазмою, що складається з безформного гелю – цитозолу (гіалоплазми). Структурованість цитоплазми підтримується цитоскелетом та зануреними гіалоплазми органелами. Цитоскелет – це сукупність мікротрубочок і мікрофіламентів, які формують опорно-рухову систему клітини. Клітини еукаріотів вкриті цитоплазматичною мембраною, вона не містить ферментів, що здійснюють синтез АТФ. Для цитоплазматичної мембрани різних клітин еукаріотів характерна здатність до ендоцитозу. Це явище пов'язане з адсорбуванням на поверхні клітини великих молекул, часточок і подальше їх поглинання завдяки піно- чи фагоцитозу.

У цитоплазмі утворюються травні вакуолі. У тваринних клітин аналоги оболонки мають вигляд шару глікопротеїдних молекул, що розміщені на зовнішній поверхні структурних білків мембрани. У рослинних клітинах оболонка виражена чітко. Основним компонентом її є клітковина – полісахарид. Центрами синтезу білку є рибосоми – субклітинні органели, що розміщені в цитозолі (білки матриксу цитоплазми та мікротрубочок, мікрофіламентів). Еукаротні клітини синтезують білок у великій кількості, який потім виводиться з клітини. Такі білки синтезуються на полісомах, розміщених на внутрішньоклітинних мембранах, разом з якими утворюють гранулярну ендоплазматичну сітку зв'язану з цитоплазматичною мембраною. Вона утворює багато замкнутих мішкоподібних структур, з якими пов'язане зберігання переробка та внутрішньоклітинний транспорт речовин.

Апарат Гольджі - це пластинчасті утворення, тільця Гольджі. Ці утворення приймають участь в процесах секреції важливих для організму речовин, які утворюються в клітинах (ферменти, гормони). У комплексі Гольджі утворюються органели клітин тварин і грибів, що здійснюють внутрішньоклітинне перетравлювання – лізосоми. Лізосоми – це спеціальні структури, які мають ферменти, котрі розщеплюють полімерні матеріали клітини (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди). Лізосома представляє собою мішечок з ферментами, стінки якого утворені мембраною.

Для рослинних клітин характерний розвиток спеціальної вакуоляторної системи. Вакуоля займає більшу частину об'єму клітини. Молоді клітини, що діляться не мають вакуолі. В разі диференціації і росту з ендоплазматичного ретикулума утворюються дрібні вакуолі, що ростуть та зливаються між собою та утворюють вакуолю.

У цитоплазмі еукаріотних клітин містяться органели – мітохондрії. Основна їх роль - забезпечення клітин енергією. Мітохондрії мають свій власний матрикс, відділений від цитозолу двома мембранами. Мітохондрії, які входять до складу цитоплазми, мають форму паличок або представлені у вигляді овальних утворень, в яких є перегородки. В кожній клітині є 2-2,5 тис. мітохондрій, які приймають участь у синтезі речовин або енергії. Внаслідок перетворень відбувається утворення АТФ.

В матриксі мітохондрій є окисно-відновні ферменти, ДНК, рибосоми. Для рослинних клітин характерно наявність пластид, найважливіших з яких є хлоропласти. Вони також оточені двома мембранами, містять матрикс, в якому є ДНК, рибосоми, тилакоїди. Функція хлоропластів - синтез вуглеводів з води і вуглекислого газу з використанням світлової енергії. В цитоплазмі рослинних клітин є органели – хлоропласти, які мають хлорофіл, за участю якого відбувається перетворення сонячної енергії в хімічну. Мітохондріях і хлоропластах винайдено молекули ДНК, які відрізняються від інших молекул ДНК, які є в клітинному ядрі.

У цитоплазмі клітин можуть траплятися органоїди без мембранної будови, як складаються з мікротрубочок – до їх належать центріолі і базальні тільця. Базальні тільця усіх тваринних клітин мають джгутики або війки. Джгутики і війки вкриті плазматичною мембраною, а базальні тільця знаходяться в цитозолі під плазматичною мембраною.

1.2. Мета та задачі вивчення дисципліни

Метою викладання дисципліни є формування теоретичних, практичних засад і принципів направлених на визначення основних

біотехнологічних напрямків використання рослинних і тваринних клітин в отриманні високої якості вторинних метаболітів необхідних для суспільства при вирішенні основних проблем шляхом удосконалення, інтенсифікації та оптимізації технології культивування клітин в біореакторах.

Освоєння дисципліни відкриє студентам нові перспективні напрямки отримання таких необхідних продуктів - вторинних метаболітів - рослинних клітин, як калусних культур, котрі широко використовуються в медицині, парфумерії, косметичі та сільському господарстві. Сучасні методи культивування тваринних клітин дозволяють отримати необхідної якості протиракові вакцини, імунорегуляторні матеріали, моноклональні антитіла, інсектициди, ферменти, гормони і вирішити проблеми зоології та ветеринарної медицини.

1.2. Універсальним центром життя є клітина. Клітинні структури властиві бактеріям, грибам, рослинам та тваринам і людині. Це говорить про їх спільне що об'єднує в царстві природи.

Клітина – структурна та функціональна одиниця усіх живих організмів. Основні компоненти клітин – білки нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, фосфоліпіди.

Типи клітин: прокаріоти – бактерії, ціанобактерії; еукаріоти – рослинні та тваринні клітини, водорості гриби.

Цитологія – наука, котра вивчає будову та функції клітин організмів.

Клітинна біотехнологія базується на властивості клітин до існування та розмноження *in vitro*, їх тотіпотентності та регенерації.

Тотіпотентність – властивості клітин рослин повністю реалізовувати свій потенціал розвитку при певних умовах вирощування.

Метод культивування ізольованих клітин та тканин на штучних живильних середовищах в стерильних умовах використовують в БТ для збереження та розмноження цінних генотипів, ембріогенезі, оздоровленні посівного матеріалу.

1.3. Етапи та історія розвитку калусів

Роль ізольованих клітин та тканин в біотехнології розглядають в 3 напрямках:

1. Пов'язаний з властивостями ізольованих рослинних клітин продукувати цінні для медицини, парфумерії, косметики та інших галузей промисловості речовин вторинного синтезу: алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони, ефірні масла. Вторинні речовини отримують як правило з каллусних тканин, які вирощені на агаризованих або рідких середовищах (суспензійна культура).

2. Використання культур ізольованих тканин для оздоровлення посівного матеріалу. Цей метод називається клональним розмноженням рослин, який дозволяє отримувати з 1 меристеми (тканини з активно ділящимися клітинами) сотні тисяч рослин в рік.

3. Використання ізольованих клітин в селекції рослин, які надають можливість отримувати швидкорослі рослини, які стійкі до засолення, низьких та високих температур, фітопатогенів, важких металів. Це направлення передбачає створення нових рослин шляхом злиття ізольованих протопластів і отримання не полових (соматичних) гібридів. Протопласт – рослинна клітина, яка не має клітинної стінки за допомогою ферментативного руйнування або механічним способом.

Перенесення в ізольовані протопласти чужорідних генів методами генної інженерії дозволяє отримувати рослини з новими властивостями. Приклад: культивування ізольованих пильників на штучних середовищах дає можливість отримувати гаплоїди - ядро, клітина, організм, який характеризується набором хромосом, який представляє половину повного набору, властивого даному виду.

Каллус- культура ізольованих клітин.

Культивування зародків дозволяє отримувати рослини з несхожого матеріалу. Запліднення в пробірці дозволяє отримувати рослини, які до того не були схрещеними.

Усі

перелічені успіхи в цих напрямках використання культур та тканин в першу чергу залежить від оптимізації фізіологічних процесів, які забезпечують нормальне ділення клітин, їх дифференцію, регенерацію з них нормальних дорослих рослин. Дедифференціація – перехід спеціалізованих, неділених клітин к проліферації..

Проліферація – новоутворення клітин та тканин шляхом розмноження.

Поліплоїд – ядро, клітина, організм, яка характеризується помноженим числом хромосом (символи 3X, 4X).

Етапи розвитку:

1 – 1892-1902 роки пов'язаний з іменами Хаберлант, Рехінгер. Вони намагалися культивувати в розчині сахарози, різні тканини. Для сегментів тополі, одувачика отримано перший каллус. Видвинуто гіпотезу про тотипотентність рослинних клітин – властивості соматичних клітин рослин повністю реалізовувати свій потенціал розвитку при певних умовах вирощування і давати утворення нової рослини..

Соматичний гібрид – рослини, отримані шляхом гібридизації соматичних клітин.

Соматична гібридизація – система, яка підключила в генетичну рекомбінацію хромосоми та гени ядра та органели без сексуального циклу, наприклад- шляхом злиття ізольованих протопластів. Вона призводить до появи гібридних клітинних ліній та соматичних гібридів.

Плазмиди – кільцева позахромосомна ДНК, яка має автономну реплікацію.

Соматичний ембріогенез - процес утворення зародишоподібних структур (ембріоїдів) в культурі тканин та клітин.

Суспензійна культура – вирощування окремих клітин або невеликих груп їх у завислому стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує аерацію.

2- 1902-1922- створено перші живильні середовища для культивування тканин тварин. Вони були природного походження, містили плазму крові та зародкову рідину.

3 – 1922-1932 – американський вчений Робінс та Котте показали можливість культивування на твердих живильних середовищах меристеми кореню томатів та кукурудзи. Але через певний час тканини гинули.

Меристема - утворювальні тканини з активно ділящимися клітинами.

4 - 1932-1940 – Готре показав можливість довгого культивування в умовах ін. вітро рослинних тканин за рахунок періодичного пересаджування на свіже середовище.

5- 1940-1960 – відкрито новий клас фітогормонів – цитокенінів (кінетину), отримано можливість стимулювати клітини їх ріст. В залежності від експланту, концентрації стимуляторів росту можна підсилювати ділення клітин та їх ріст, індуциувати морфогенез.

Морфогенез - процес формування росту та розвитку органів (органогенез), тканин (гістогенез), клітин (цитогенез, клітинна диференцировка)

Експлант – фрагмент тканини або органу, який інкубується на живильному середовищі самостійно або використовується для отримання каллусів.

Ген – відрізок хромосоми (молекули ДНК), який кодує структуру однієї або декілької поліпептидних ланцюгів, або молекули РНК, або певну регуляторну функцію.

Генотип – конкретний набір хромосом.

Генофонд – сукупність генів популяції.

6-1960-1975 – Коккінгом отримано метод отримання ферментативним шляхом ізольованих протопластів, що відчинило новий шлях до створення соматичних гібридів.

7-1975-2009 – розвиток техніки культивування ін. вітро, вивчаються методи біології культивування об'єктів, розроблено методи електролізиту ізольованих протопластів, методи мутагенезу – змінення в хромосомі, яка передається по спадку.; клітинна селекція, галоїдні рослини – ядро, клітина, організм, який характеризується набором хромосом, який представляє половину повного набору, який властивий даному виду. Розкрито методи отримання векторів, які створені на основі ТІ, Рн – плазмід.

Вектори – люба плазміда або аг, в які може бути вбудована чужерідна ДНК з метою клонування.

Плазміда – кільцева позахромосомна ДНК, яка має можливість автономна реплікуватися.

Реплікація – самоудвоєння ДНК шляхом утворення копії за допомогою набору ферментів (ДНК-полімерази, лігази).

Профаг – фаговий ген, інтегрований в бактеріальну хромосому.

Контрольні запитання:

1. Що означає термін «клітина»?
2. Яким чином розмножуються клітини?
3. Які періоди розвитку біотехнології рослинних клітини ви знаєте?
4. Що розуміють під терміном «плазмід»?
5. Що відносять до основних властивостей живих організмів?
Яким живим організмам властиві клітинні структури?
6. Що вивчає предмет цитології?
7. Якими властивостями відрізняються тваринні клітини від рослинних?

Тема 2. Основні етапи отримання культур каллусних клітин

2.1. Загальна характеристика каллусних тканин

Культура ізолюваних тканин представлена каллусними та пухлинними тканинами. *Каллусна культура* – це неорганізована проліфіруюча тканина, яка складається з дедиференцированих клітин, пізніше вони стають диференцированими, тобто каллусними.

Каллус - мозоль, утворюється як на ізолюваних тканинах (експлантат) ін витро, так і на поранених тканинах. Каллус буває білого або жовтуватого кольору, рідко світло-зеленого. Темно-коричнюва забарвленість виникає при старінні каллусних клітин та пов'язана з накопиченням в них фенолів, які далі окислюються у хінони. Для попередження цього процесу окислення в живильні середовища вносять антиоксиданти.

Калусна тканина аморфна, не має конкретної анатомічної форми, але залежить від умов вирощування і внаслідок цього буває різної консенстенції:

1 – рихлою, яка складається з різних оводнених клітин, які легко розкладаються на окремі агрегати;

2 - середньої щільності, з гарно вираженими меристемними очагами;

3 - щільною, в якій диференцируються елементи камбію та провідникової системи.

Диференціація комплекс процесів, які призводять до різниці між дочірніми та материнськими клітинами та навпаки.

Обов'язковою умовою дедиференцировки рослинних клітин та перетворень їх в каллус є присутність в живильному середовищі 2 фітогормонів – ауксини та цитокеніни.

Ауксини визивають процес дедиференцировки клітин, підготовлюють їх до ділення, а цитокеніни – проліферацію (ділення) дедиференцированих клітин.

Приклад: якщо в живильне середовище не помістити фітогормони, а вирощувати з кусочка стеблини, листка каллусну

тканину, в нас нічого не вийде, тому що не буде відбуватися ділення клітин.

Кожна клітина проходить 3 фази росту:

1 – ділення

2 – розтягування;

3 – диференціацію, яка характеризується стовщення клітинної оболонки та відбувається втрата клітиною можливості до ділення.

Для того щоб диференційовані клітини мали можливість до ділення, необхідно щоб відбулася їх дедиференцировка.

Розмноження дедиференцированих клітин відбувається в анархічному, неорганізованому рості, в разі чого утворюється калусна тканина.

Якщо в середовища додавати лише ауксини – клітини не діляться та переходять до фази розтягання; якщо не додавати ауксини - відбувається фаза старіння. Таким чином, якщо дедиференцировка ділої клітини пов'язана з індукцією ділення, деспеціалізацією клітини в присутності гормонів,- тоді буде відбуватися індукція ділення, котра призводить до утворення калусів.

При переході дедиференцированої клітини до неорганізованого розмноження, яке приводить до утворення калусів, в клітинах проходять біохімічні реакції та цитологічні перетворення.

2.2.Визначення умов дедиференцировки рослинних клітин

Дедиференцировка відбувається з використання запасних речовин та порушенню спеціалізованих клітинних органел. Через 6-12 годин після індукції дедиференцирована клітинна оболонка розривається та розбухає, збільшується число вільних рибосом, збільшується число елементів апарату Гольджі, збільшуються розміри та число ядришек, а потім через 48-72 години відбувається ділення клітин.

Калусна клітина має свій цикл розвитку, який повторює цикл інших рослин – тканин – ділення, розтягання, диференцировка, потім старіння та відмирання. З метою продовження терміну існування калусів треба експлант через 4-6 тижнів перенести в свіже живильне середовище - пасірування – таким чином їх можна зберегти десятки років.

2.3. Особливості росту каллусних клітин

Каллуси ін вітро зберігають особливості виду рослин, також можливість до синтезу вторинних метаболітів. Морозостійкість та можливість до закалювання властиві лише каллусам отриманих від морозостійких рослин. Аналогічно щодо солоності, температурних факторам.

Але каллуси володіють окремими властивостями, які різняться від нормальних рослин. Це утворення спецефічних білків та зменшення кількості білків, які характерні для фотосинтезуючих клітин листка. Каллуси володіють великою генетичною гетерогенністю та фізіологічною асинхронністю. Клітинний цикл у каллусів значно довший ніж у рослин, які вирости в Ґруні. Особливістю є гетерогенність каллусів за віком. Тобто в каллусній тканині присутні одночасно молоді клітини, старі. Енергетичний обмін значно занижений, тобто необхідно менше споживати кисню ніж звичайні рослини. В каллуса відбувається здвиг співвідношення між диханням та бродінням в сторону посилення бродіння, тобто зниження ефекту Пастера (аеробні гліколіз – без кисневе розщеплення вуглеводів в присутності кисню). Ефект Пастера продавлення процесу бродіння диханням в присутності кисню. В каллусах під час дихання іде процес бродіння – без кисневе розщеплення вуглеводів при неорганізованому рості, в разі чого накопичується етиловий спирт в ділимих клітинах.

2.4. Генетика каллусів

Каллуси володіють генетичною гетерогенністю. Генетична неоднорідність виражається різноманітною плоїдністю – набором хромосом., тому генетично стійким є меристематичні тканини.

В каллусах є клітини, які мають диплоїдний набір хромосом, який властивий початковій рослині, та поліплоїдні клітини – 3,4,5 хромосомних набори. Може бути анеуплоїдія – збільшення або зменшення хромосомного набору на декілька хромосом.

Чим більше культивувати тканини, тим вони розрізняються за плоїдністю. Виникають хромосомні оберайї – зовнішній вигляд, обмін речовин, швидкість росту – те що видно під мікроскопом. Можуть

бути хромосомні мутації – які призводить до морфологічних змін та фізіолого – біохімічних властивостей клітин.

Основні причини неоднорідності – неоднорідність експланту; задовге пасерування клітин, яке приводить до накопиченню мутацій; порушення корелятивних зв'язків при ізолюванні ділянок рослин та розміщення їх на живильних середовищах; присутність фітогормонів – ауксини, цитокеніни, особливо 2,4 Д. Але такий фактор може бути позитивний – утворення мутантів з вираженими властивостями – стійкість до несприятливих умов, клітинна селекція, продуктивність.

2.5.Особливості каллусів та пухлини

Каллусні клітини можуть ділитися при наявності гормонів в середовищі, але при довгому культивуванні можуть продовжувати ріст без гормонів. Такі клітини називають «привикшими», або хімічними пухлинами, це відбувається за рахунок змін в активності генів,, які відповідають за синтез гормонів, тому такий процес носить епігеномний характер та мутації. Такі тканини не можуть бути повноцінними та не піддаються регенерації. В усіх каллуса з 4 пасажу починається порушення процесу регенерації, а потім повністю втрачають можливість до регенерації. Зокрема існують пухлини біологічного походження – визвані , бактеріями , вірусами; генетичні пухлини – які утворилися на міжвидових гібридах різних рослин.

Загальними властивостями є гормоннезалежність цих видів клітин. Це основний відрізняючий фактор каллусів від пухлинних тканин. Це пояснюється тим, що пухлини самі синтезують гормони для росту. Пухлинні клітини становляться в разі дії Агро бактерій, які включають в рослинні клітини ФАКТОР ТІП, який призводить до перетворення за 36 годин нормальної клітини в онкогенну. Цей фактор тримається в плазміді бактеріальної клітини в рослинну ядерну ДНК. Інтерпретація ТІ-плазмід агробактерій в хромосому рослин призводить до появи пухлин та гормон незалежного росту її на штучних середовищах. Ці явища пов'язані з експресією генів , які контролюють синтез ауксинів та цитокенінів, призводить до дедиференцировці та проліферації . Крім того Т-ДНК детермінує синтез нового класу амінокислот, які не зустрічаються в природі – опінів. Ці речовини не є причиною пухлин вони лише синтезуються в

готовій пухлині. Опіни- похідні амінокислот, різних кетокислот, цукрів.

2.6.Техніка введення в культуру і культивування ізольованих тканин

Необхідною умовою роботи з культурою ізолюваних тканин є дотримання строгої стерильності. Багате живильне середовище є прекрасним субстратом для розвитку в ній мікроорганізмів, а ізолювані від рослини фрагменти (експланти), які поміщають на живильне середовище, легко вражаються мікроорганізмами. Тому треба стерилізувати як експлант, так і живильне середовище. Всі маніпуляції з ізолюваними тканинами (введення в культуру, пересадка на свіже живильне середовище) проводять в асептичному приміщенні (ламіна́р-боксі) стерильними інструментами. Стерильність треба дотримувати і під час культивування ізолюваних тканин, особливо при перепаді температури і вологості, оскільки при цьому пробки стають вологими і по ним в пробірку можуть проникати мікроорганізми.

Стерилізацію експланта, а також насіння проводять шляхом витримки їх 5—20 хв в стерилізуючих розчинах з подальшою багатократною промивкою експланта стерильною водою. Час стерилізації залежить від характеру експланта і від стерилізуючої активності розчину. Зазвичай насіння стерилізують 10—20 хв, а вегетативні частини 5—10 хв. Приклади стерилізуючих розчинів приведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1. Стерилізація початкового рослинного матеріалу

Об'єкт	Час стерилізації, хв.			
	діацид, 0,1 %	сульема, 0,1 %	гіпохлорит (N8, Ca) 5—9 %-вий	пероксид водню, 10 %-вий
Насіння сухе	15—20	10—15	15—20	12—15
Набряклі тканини	6—10	6—8	10—15	6—8
м'ясистого кореня	20—30	15—20	15—20	—
бульби стебла, що одеревіло	20—40	20—25	20—25	—
Листя	1-3	1—3	3—6	3—5
Апекси	1—10	1—7	3—15	2—7

Органи рослин, з яких беруть експлант для введення в культуру, заздалегідь миють мильним розчином з щіткою і споліскують водою, що дистильовує, а потім занурюють на декілька секунд в 70 %-ний етанол. Насіння занурюють в спирт на 1—2 хв. Окрім власне стерилізуючої дії спирту обробка тканин етанолом перед приміщенням в основний стерилізуючий розчин підвищує стерилізуючий ефект останнього.

Після стерилізації рослинні об'єкти повинні бути ретельно промиті стерильною водою.

Поверхнева стерилізація звільняє експлант тільки від зовнішньої інфекції. Якщо ж тканини експланта мають внутрішню інфекцію, то його необхідно обробити антибіотиками. Особливо багаті внутрішньою інфекцією тканини тропічних і субтропічних рослин, що мають крупні судини. Забруднення культур грибами або бактеріями зазвичай виявляється через 1 — 14 днів після посадки. Забруднені культури необхідно негайно ж видалити, щоб уникнути зараження повітря в світловій кімнаті.

Живильні середовища стерилізують в автоклаві при температурі 120° С і тиску 0,75—1 атм протягом 20 хв. Якщо до складу живильного середовища входять речовини, що руйнуються при високій температурі, їх піддають холодній стерилізації, пропускаючи через бактерійні фільтри з діаметром пор 0,22—0,45 мкм, після чого додають в охолоджене до 40° С основне середовище.

Посуд, заздалегідь загорнутий у фольгу або обмотувальний папір, стерилізують сухим жаром в сушильній шафі при температурі 160° С протягом двох годин.

Живильні середовища для культивування ізолюваних кліток і тканин повинні включати всі необхідні рослинам макроелементи (азот, фосфор, калій, кальцій, магній, сірку, залізо) і мікроелементи (бор, марганець, цинк, мідь, молібден і ін.), а також вітаміни, вуглеводи, фітогормони або їх синтетичні аналоги. Деякі живильні середовища містять гідролізат казеїну, амінокислоти. Крім того, до складу живильних середовищ входить ЕДТА (етилендіамінтетраоцетова кислота) або її натрієва сіль, які покращують доступність заліза для кліток.

Для отримання калусної тканини в окремих випадках до живильного середовища додають рідкий ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), каштана і ін.

Вуглеводи є необхідним компонентом живильних середовищ для культивування ізолюваних кліток і тканин, оскільки в більшості випадків останні не здатні до автотрофного живлення. Найчастіше як вуглевод використовують сахарозу або глюкозу в концентрації 2—3 %.

Фітогормони необхідні для дифференцовки кліток і для індукції клітинних ділень. Притому для отримання калусних тканин до складу живильних середовищ повинні обов'язково входити ауксини, що викликають клітинну диференційовку, і цитокініни, що індукують ділення клітин. У разі індукції стеблового морфогенезу вміст ауксинів в середовищі може бути понижене або вони можуть бути повністю виключені з живильного середовища.

На без гормональному середовищі ростуть пухлинні і «звичкі» тканини. Автономність по відношенню до обох гормонів або до

одного з них пов'язана із здатністю цих кліток синтезувати гормони.

Як джерела ауксинів в живильних середовищах використовують 2,4-дихлорфеноксиоцетову кислоту (2,4-Д), індолив-3-оцетову кислоту (ІОК), нафтило оцтову кислоту (НОК). Для отримання рихлого каллусу, що добре росте, частіше застосовують 2,4-Д, оскільки ІОК майже в 30 разів менш активна, ніж 2,4-Д.

Як джерела цитокінінів в штучних живильних середовищах використовують кинетин, 6-бензиламінопурин (б-БАП), зеатин. б-БАП і зеатин проявляють вищу активність в підтримці зростання ізолюваних тканин і індукції органогенезу в порівнянні з кінітином. До складу деяких середовищ входить аденін.

В даний час відоме велике число різних по складу живильних середовищ, але найчастіше вживана при вирощуванні ізолюваних рослинних тканин в умовах *in vitro* середовище Т. Мурасіга і Ф. Ськуга, вперше складена в 1962 р. Це середовище містить добре збалансований склад живильних речовин і відрізняється від інших, як правило, співвідношенням амонійного і нітратного азоту (табл. 2.2).

Для приготування твердих живильних середовищ використовують агар-агар, який є полісахаридом, що отримується з морських водоростей.

З метою раціонального використання часу розчини солей макро- і мікроелементів, а також вітамінів і фітогормонів готують більш концентрованими, що дозволяє багато разів їх використовувати. Концентровані (маткові) розчини зберігають в холодильнику.

Таблиця .2. Склад живильних середовищ для
ізолюваних тканин рослин

культивуван

Компоненти живильного середовища	Концентрація, мг/л			
	Мурасіга - Ськуга	Гамір - борга	Шенка— Хиль- Дебрандта	Грес- Хофс- Доу
NH ₄ NO ₃	1650	2500	2500	—
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	—	300	—
KN ₃	1900	—	—	1000
Ca ₂ CO ₃ • 2H ₂ O	440	150	200	150
MgSO ₄ • 7H ₂ O	370	250	400	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	130	—	200
K ₂ PO ₄	170	—	—	—
ІДТА	37,3	37,3	20,0	37,3
FeSO ₄ • 7H ₂ O	27,95	27,-85	15,0	27,8
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	—	150	—	90

Умови культивування. Для успішного культивування ізолюваних кліток і тканин рослин необхідно дотримувати певні умови вирощування. Більшість калусних тканин не потребують світла, оскільки не мають хлоропластів і харчуються гетеротрофно. Виняток становлять деякі зелені калусні тканини, такі, як калусна тканина мандрагори. В деяких випадках калусні тканини, не здатні до автотрофного живлення, все ж таки вирощують на безперервному освітленні, що є необхідною умовою подальшого успішного морфогенезу, як у люцерни. Більшість же калусних тканин отримують в темноті або при розсіяному світлі.

Детерміновані до морфогенезу тканини переносять на світло і далі культивують їх при освітленості 1000—4000 Люкс.

Культивування ізолюваних меристем і їх мікро розмноження також відбувається на світлу. Освітленість факторостатної (світловий) кімнати повинна складати залежно від культури 1000—10 000 Люкс. Необхідно враховувати фотоперіод, який потрібний для даного культивованого об'єкту.

Вологість в культуральній кімнаті повинна складати 60—70%. Сухіше повітря сприяє усиханню живильного середовища в

пробірках і колбах, якщо вони закриті ватяними пробками, зміні її концентрації і порушенню умов культивування. Для підвищення вологості в кімнаті можна використовувати піддони з водою.

Оптимальна температура для більшості культивованих тканин 25—26°C, для культури тканин тропічних рослин вона може досягати 29—30° С. У разі індукції морфогенезу температуру знижують до 18—20° С.

Як найкращі, світловий і температурний режими, а також режим оптимальної вологості можна створити за допомогою кліматичних камер.

2.7.Культура каллусних тканин

Культура ізолюваних тканин зазвичай буває представлена каллусними або рідше — пухлинними тканинами. Каллусна культура — це неорганізована проліферируюча тканина, що складається з дифференційованих кліток. Надалі вони спеціалізуються як каллусні, тобто стають особливим чином дифференційованими. Каллус, що означає «мозоль», може утворюватися як на ізолюваних шматочках тканини (експлантах) *in vitro*, так і на рослині при пораненні.

Каллусна тканина *in vitro* в основному буває білого або жовтуватого, рідше ясно-зеленого кольору. Дуже рідко вона може мати інтенсивне зелене забарвлення (у мандрагори). Темно-коричневе забарвлення виникає частіше при старінні каллусних кліток і пов'язана з накопиченням в них фенолів. Останні окислюються в хинони. Для позбавлення від них в живильні середовища вносять антиоксиданти.

Каллусна тканина аморфна і не має конкретної анатомічної структури, але залежно від походження і умов вирощування вона може бути різній консистенції: 1) рихлою, такою, що складається з сильно оводнених кліток, легко розпадається на окремі дрібні агрегати; 2) середній щільності, з добре вираженими меристематичними вогнищами; 3) щільною, в якій диференціюються елементи камбію і провідної системи.

Обов'язковою умовою дифференційовки рослинної клітки і перетворення її в каллусну є присутність в живильному середовищі

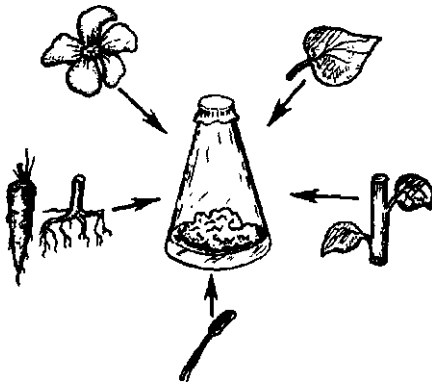


Рис. 2.1. Отримання культури калусних кліток

представників двох груп фітогормонів: ауксинів і цитокінінів. Ауксини викликають процес диференційовки клітки, що готує її до ділення, а цитокініни — проліферацію (ділення) диференційованих тканин із різних експлантів у живильне середовище без фрагментів стебла, кореня, листя. Помістити шматочок стебла, листа, кореня (без верхівки) або будь-який інший рослинний експлант, що складається із спеціалізованих (диференційованих) кліток, то ділення клітин не відбудеться і калусна тканина не утвориться. Це пов'язано з нездатністю диференційованих кліток до ділення. Кожна клітка проходить три фази зростання: 1) ділення; 2) розтягування; 3) диференційовку. Характерною межею завершальної фази зростання є потовщення вторинної клітинної оболонки і втрата кліткою здібності до ділення. Для того, щоб диференційовані клітки знов придбали здібність до ділення, необхідно, щоб відбулася їх диференційовка, тобто клітки як би повернулися в меристематичний стан. Розмноження диференційованих кліток приводить до анархічного, неорганізованого зростання, внаслідок чого утворюється калусна тканина. Таким чином, перетворення спеціалізованої клітки в калусну пов'язане з індукцією клітинного ділення, здібність до якого вона втратила в процесі диференційовки.

У серцевинній паренхімі тютюну (СПТ) відсутність цитокінінів в живильному середовищі блокує клітинний цикл в

премітотичному періоді. Тому, якщо в живильному середовищі присутній тільки ауксин, клітини не діляться і після чотириденної латентної фази переходять до зростання розтягуванням. Одні цитокиніни без ауксинів приводять до такого ж старіння тканин СПТ, як і на середовищі без гормонів. Приведені дані, отримані для СПТ, не завжди можуть пояснити всіх випадків, коли калусна тканина виходить на середовищі з одним гормоном, наприклад, калусоутворення на середовищі з 2,4-Д без цитокинінів у незрілих зародків пшениці або отримання калусу на сім'ядолях соняшнику на середовищі з цитокинінами, але без ауксинів. Встановлено, що результати багато в чому залежать від ендогенних гормонів, що містяться в клітках того або іншого експланта, тобто пов'язані з особливостями їх гормонального статусу.

Є нові уявлення, згідно яким не ауксини і цитокиніни, а полісахариди і якісь інші індуктори викликають ділення клітин, що приводять до утворення калусу.

Процес переходу до калусного зростання в базальній частині апекса починається із зупинки клітинних ділень. Лаг-фаза продовжується 24—48 ч. Протягом цього часу клітки збільшуються в розмірах і тканина розпушується. Після закінчення лаг-фази клітки починають швидко ділитися, утворюючи кал лусну тканину. Таким чином, якщо дифференційовка спеціалізованої клітки пов'язана з індукцією ділення під впливом фітогормонів, то дифференційовка меристемати - чесанням клітки, що ділиться, пов'язана із зупинкою ділень, деспеціалізація клітки і лише після цього — з індукцією ділень, що приводить до калусоутворення.

Ефект, що викликається дією одних і тих же фітогормонів, може бути різним залежно від фізіологічної характеристики тканини-мішені. Компетентність її в розглянутих прикладах визначається ступенем диференціювання кліток.

Перехід клітки *in vitro* з диференційованого стану до диференційованих і активних клітинних ділень обумовлений зміною активності генів (геномною мінливістю). Активування одних генів і репресування інших приводить до зміни в білковому складі кліток. У калусних клітках з'являються специфічні білки і одночасно зникають або зменшуються в кількості білки, характерні для фотосинтезуючих кліток листа. У дводольних рослин процес

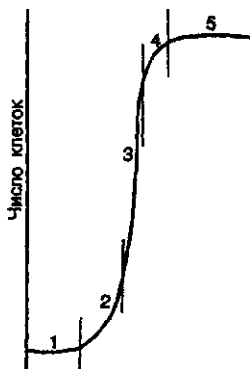


Рис. 2.2. Модельна крива ростового циклу при періодичному виросуванні калусних тканин. Фази зростання:

1 — латентна; 2 — логарифмічна; 3 — лінійна; 4 — уповільнення;
— стаціонарна

репресії і дерепресії генів, лежачий в основі диференційовки, відбувається легше, ніж у однодольних.

Під час переходу диференційованої клітки до неорганізованого анархічного розмноження, що приводить до утворення калусної тканини, в клітках відбуваються біохімічні і цитологічні зміни. Диференційовка починається з використання запасних речовин і руйнування спеціалізованої клітинної органели. Через 6—12 ч після індукції диференціювання клітинна оболонка розпушується і розбухає, збільшується число вільних рибосом, зростає число елементів апарату Гольджі, збільшуються розміри і число ядерць.

Всі ці зміни передують початку ділень, які починаються через 48—72 ч.

Слід враховувати, що в клітках експланта на початку культивування можуть спостерігатися зміни в метаболізмі, викликані як диференційовкою, так і травматичними синтезами. Для розділення цих процесів краще проводити предінкубацію експланта на безгормональному середовищі 3—6 сут.

Каллусна клітка має свій цикл розвитку і повторює розвиток будь-якої клітини, включаючи ділення, розтягування і диференціювання, після чого настає старіння і відмирання клітки. Каллусне диференціювання можна назвати вторинним, але її не слід плутати з вторинною диференційовкою клітки, лежачої в основі морфогенезу.

Для того, щоб не відбулося старіння, втрати здібності до ділення і відмирання каллусних кліток, первинний каллус, що виникає на експлантах, через 4—6 тижнів переносять на свіже живильне середовище. Цю операцію називають пасивуванням. При регулярному пасивуванні здібність до ділення може підтримуватися протягом десятків років.

Ростова крива каллусних кліток має Э-подібну форму (рис. 2.2). Такий характер зростання легко виявити у суспензійних культур каллусних кліток. Крива зростання включає п'ять фаз. Під час 1-ої латентної або лаг-фази збільшення числа або маси кліток не відбувається. Клітки в цей період готуються до ділень. Наступна, 2-га фаза—логарифмічна або експоненціального зростання — характеризується найбільшою мітотичною активністю і збільшенням маси каллусної культури, крім того, зростання відбувається з прискоренням. 3-тя фаза — лінійна, в якій швидкість росту кліток постійна. Далі настає 4-та фаза — сповільненого зростання, коли мі- тотична активність кліток різко знижується.

У наступній — стаціонарній 5-ій фазі ростова крива виходить на плато. У цей період починається деградація кліток, проте вона ще зрівноважується зростанням числа кліток за рахунок їх ділення; в цілому ж швидкість наростання клітинної маси дорівнює нулю. Після стаціонарної фази настає відмирання (деградація) кліток, під час якої число і маса живих клітин зменшується.

2.8. Особливості калусних кліток

Калусні клітки *in vitro* зберігають багато фізіолого-біохімічних рис, властивих нормальним кліткам, що входять до складу рослинного організму. Калусні клітки зберігають здібність до синтезу вторинних метаболітів. Морозостійкість і здібність до гартування властиві калусним клітинам, отриманим від морозостійких рослин. Цією властивістю не володіють калусні тканини, отримані від тропічних і субтропічних культур. Таким чином, стійкість до низьких температур зберігається під час переходу клітки до калусного зростання. Калусним тканинам властива і фотоперіодична реакція, що пов'язане із збереженням активності фітохрому.

Загальним у калусних і нормальних кліток рослини є і ще ряд ознак, зокрема, стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засоленню.

Разом з тим калусні клітки володіють окремими властивостями, що відрізняють їх від нормальних. У них з'являються специфічні білки і зменшується кількість білків, характерних для фотосинтезуючих кліток листа, або вони зовсім зникають. Калусні клітки відрізняються великою генетичною гетерогенністю і фізіологічною асинхронністю.

В результаті виходу з-під контролю організму зростання калусних кліток відбувається неорганізовано, асинхронно, і є необмеженим. При пересадках на свіже живильне середовище культура калусної тканини моркви, отримана Р. Готре більше 60 років тому, до цих пір росте в колекції.

Клітинний цикл у калусних кліток триваліший, ніж у рослин, що виростають у відкритому ґрунті.

Особливістю каллусних кліток є гетерогенність за віком. У калусної тканині одночасно присутні клітки молоді в 0-фазі, старі в G2- і S-фазах циклу клітинних ділень.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні каллусних кліток. Вони споживають менше кисню в порівнянні з нормальними. Ще в 1938 р. Рамсгорн виявив таку ж особливість у меристематичних кліток, отже, ця властивість кліток, що активно діляться. Дихальний коефіцієнт (Д.К) каллусних кліток > 1 . Так, в каллусі гороху $Д.К > 3,5$ (А.В. Романова і ін., 1988). Це свідчить про зрушення співвідношення між диханням і бродінням у бік посилення бродіння, тобто про зниження ефекту Пастера. Під ефектом Пастера розуміють придушення бродіння диханням у присутності кисню. Збільшення дихального коефіцієнта при незмінному дихальному субстраті говорить про те, що дихання перестає пригнічувати бродіння і навіть у присутності кисню в каллусних клітках разом з диханням йде без кисневе розщеплювання вуглеводів — бродіння. Про без кисневе розщеплювання вуглеводів при неорганізованому зростанні свідчить накопичення етилового спирту в клітках, що діляться. Такі дані отримані при індукції неорганізованого зростання на інтактних проростках гороху (Г.М. Артамонова, 1975, 1978).

Мітохондрії в каллусних клітках так само, як і в меристематичних, є слабо розвиненими, в них мало крист, що не може не робити впливу на активність аеробного дихання.

2.9. Генетика каллусних кліток

Тривалий час вважали, що каллусні клітки генетично строго однорідні. Проте у 60-х роках було з'ясовано, що клітини калусної тканини володіють вираженою генетичною гетерогенністю. Генетична неоднорідність каллусних кліток виражається перш за все в різній плодоїдності, тобто каллусні клітки відрізняються по числу хромосом. Генетично стабільними *in vitro* є меристематичні тканини.

У каллусних і суспензійних культурах зустрічаються клітки, що мають диплоїдний набір хромосом, властивий початковій рослині, поліплоїдні клітки, що містять 3, 4, 5 і більш хромосомних наборів.

Разом з поліплоїдією в культурі калусних тканин можна нерідко спостерігати анеуплоїдію (зростання або зменшення хромосомного набору на декілька хромосом). Чим довше культивування калусних кліток, тим більше вони розрізняються по плодючості. У калусних клітках тютюну через чотири роки культивування зовсім не залишається диплоїдних кліток: всі клітки стають поліплоїдними або анеуплоїдними. Цей факт указує на те, що зміна плодючості відбувається під впливом умов культивування і перш за все вхідних до складу живильного середовища речовин. Проте можна інтерпретувати його і інакше. Поліплоїдні клітки мають меншу лаг-фазу і тому швидше переходять до ділень, чим диплоїдні. Внаслідок цього вони і отримують перевагу в подальших пасажах. Швидше за все, вплив роблять обидві причини.

Окрім зміни плодючості, культивування кліток і тканин рослин *in vitro* викликає поява в клітках хромосомних аберацій. Останні позначаються на біологічних особливостях культивованих тканин, змінюючи їх зовнішній вигляд, обмін речовин, швидкість росту. Разом з видимими під мікроскопом хромосомними мутаціями в культивованих клітках можуть виникати зміни, що не виявляються мікроскопічно. Ці зміни можуть зачіпати як незначні ділянки хромосом, так і структуру генів. Генні мутації виявляються по зміні морфології і фізіолого-біохімічних властивостей кліток.

Які ж причини генетичної нестабільності культивованих кліток? Таких причин декілька. Перш за все — це генетична неоднорідність початкового матеріалу (гетерогенність експланта). У багатьох рослин диференційовані тканини характеризуються наявністю кліток різної плодючості і лише активно проліферируючі протягом онтогенезу тканини, такі, як верхівкові меристеми, камбій та інші, залишаються завжди диплоїдними. Іншою причиною може бути тривале пасивування тканинних і клітинних культур, що приводить до накопичення в них генетичних змін, зокрема до нерівномірної зміни плодючості. Порушення корелятивних зв'язків при ізолюванні ділянок тканин рослин і приміщенні їх на живильне середовище також приводить до генетичної нестабільності кліток. Подібні результати можуть бути зв'язані і з впливом на генетичний апарат клітки що входять до складу живильних середовищ фітогормонів. Як і гормони, в живильні

середовища для каллусоутворення обов'язково входять ауксини і цитокиніни. Про мутагенну дію цих речовин відомо з цілого ряду робіт. Найбільш активним мутагенним препаратом є 2,4-Д, що входить до складу більшості живильних середовищ. Цитокиніни, зокрема кинетин, сприяють поліплоїдизації кліток.

Генетична різноманітність каллусних кліток дозволяє використовувати їх для клітинної селекції на стійкість до несприятливим чинником середовища, фітопатогенам і на підвищену продуктивність.

2.10 Вплив гормонів на ріст культури

Каллусні клітки можуть ділитися тільки за наявності гормонів в живильному середовищі. Проте при тривалому культивуванні вони у ряді випадків можуть придбати здатність рости на середовищі без гормонів, тобто стають автономними по відношенню до ауксинам і цитокинінам. Такі клітки називаються «звиклими». Нерідко тканини, утворені «звиклими» клітками, називають хімічними пухлинами. «Звиклі» тканини, як і пухлинні, в більшості випадків не здібні до нормальної регенерації і утворюють лише тератоми, хоча за деякими даними з них в окремих випадках виходять нормальні регенеранти.

Слід зазначити, що у всіх каллусних тканин в процесі культивування, у деяких культур вже починаючи з 4-го пасажу, помітно знижується, а потім і повністю втрачається здатність до регенерації. Із старих пересадкових культур отримати рослини-регенеранти не вдається.

Поки немає чіткої відповіді про причини «звикання». Можливо, що воно пов'язане з тривалою дією на клітки гормонів, що підтримують їх в диференційованому або активно проліферуючому стані.

Окрім «звиклих» тканин, що є хімічними пухлинами, існують пухлини рослинного походження, викликані бактеріями, вірусами, а також генетичні пухлини, що виникають на міжвидових гібридах різних рослин. Найбільш поширеними в природі і такими, що представляють найбільший інтерес для дослідників є корончаті галли-пухлини, що індукуються у дводольних рослин

агробактеріями (*Agrobacterium*). Часто зустрічаються ще два види дійсних пухлин у рослин - бородатий корінь і стебловий галл, схожий з корончатим галлом.

Загальною властивістю «звиклих» і пухлинних рослинних тканин є їх гормонезалежність, тобто здатність рости на середовищах без гормонів. Це основна їх відмінність від калусних тканин, для яких присутність гормонів в живильному середовищі є необхідною умовою диференційовки і проліферації кліток.

У «звиклих» тканинах, так само як і в пухлинних, йде інтенсивний синтез власних гормонів, тому вони не потребують внесення їх в живильні середовища.

Зовні гормонезалежні тканини не відрізняються від калусних, і основною їх відмінністю є придбання здібності до інтенсивного синтезу гормонів. Ця властивість є загальною як для «звиклих», так і для пухлинних кліток. Проте шляхи для вирішення цього завдання у них різні. У «звиклих» тканин гормонезалежність досягається в результаті зміни активності генів, що відповідають за синтез ферментних білків, що беруть участь в побудові молекул гормонів, отже, гормонів, що зрештою відповідають за синтез. Таким чином, зміни в даному випадку мають епігеномний характер, хоча не можна виключити і можливість мутацій. Для того, щоб відповісти на питання, чи є зміни в «звиклих» клітках епігеномними або генетичними, можна перевірити, чи зберігається властивість гормонезалежності в ряду: клітка — рослина — клітка. З цією метою необхідно отримати регенерацію в «звиклій» тканині, а потім експлант від рослини, що регенерувала, посадити на живильне середовище без гормонів або без одного з гормонів. Якщо в такому середовищі клітки ділитимуться, тобто виявляться автономними по відношенню до гормонів, то це означає, що властивість гормонезалежності передається по спадку наступним поколінням, а отже, воно має генетичне походження. Якщо ж на безгормональному середовищі клітки ділитися не будуть і калусної тканини не утворюють, тобто гормонезалежність не успадковується, то це дозволяє зробити висновок про епігеномний характер змін. Проведені експерименти говорять на користь епігеномного характеру гормонезалежності в «звиклих»

тканинах. Проте таким шляхом можна перевірити тільки ті «звиклі» клітки, які не втратили здатність до регенерації. В той же час переважну більшість «звиклих» кліток втрачає здатність до регенерації, що утрудняє використання запропонованого методу для визначення характеру природи гормоннезалежності.

У пухлинних тканинах синтез гормонів пов'язаний з перенесенням в рослинну клітку бактерійного гена, що відповідає за цей процес.

У 40-х роках ХХ в. Браун, учень Ф. Уайта, показав, що культура тканини корончатогаллової пухлини навіть у відсутності агробактерій, наприклад, після загибелі їх під впливом підвищеної температури, зберігає пухлинні властивості. На штучному живильному середовищі без гормонів тканина корончатого галла, позбавлена бактерій, продовжувала інтенсивно проліферувати. Тканини корончатих галлів містять вищі рівні ауксинів, чим нормальні, і продукують декілька цитокинінів. На підставі своїх дослідів Браун прийшов до висновку, що рослинні клітки якимсь чином трансформуються (перетворюються) в пухлинні після дії *Agrobacterium tumefaciens*. Було висунуто припущення, що агробактерії вводять в клітки рослинний чинник Тір (*Tumor inducing principle*), який за 36 ч перетворює нормальні клітки на пухлинні. Надалі виявилось, що Тір є ДНК і знаходиться у великій плазмі агробактерій (Ті-плазмида). Онкогенна активність може бути втрачена в результаті видалення з бактерійної клітки всієї Ті-плазмиди або її певної частини.

У 1977 р. Чилтонс та ін. довели, що пухлини корончатого галла виникають в результаті включення певного фрагмента Ті-плазмиди агробактерій в рослинну ядерну ДНК.

Таким чином, сегмент Ті-плазмиди (Т-ДНК) інтегрується в хромосому і стає частиною спадкового апарату трансформованої (пухлинної) рослинної клітки. Інтеграція Т-ДНК Ті-плазмиди агробактерій в хромосому рослини приводить до появи пухлини і гормоннезалежності зростання пухлинних кліток на штучних живильних середовищах. Обидва ці явища тісно зв'язані один з одним, оскільки саме гормоннезалежність, що є наслідком

експресії генів, контролюючих синтез ауксинів і цитокининів, приводить до дифференційовки і проліферації кліток.

Ті-плазмід є природним вектором (переносником) нових генів в рослини. Шлях синтезу ауксинів і цитокининів клітками пухлин, що індукуються агробактеріями, інший, чим у нормальних і «звиклих» кліток. Він більш простий і короткий. За допомогою мутагенів стало можливим ідентифікувати ділянки Т-ДНК, контролююча зміни гормональної активності. Було з'ясовано, що не один локус, а ряд генів відповідальні за пухлинне зростання.

Окрім ауксинів і цитокининів Т-ДНК детермінує синтез галлами нового класу амінокислот, що не зустрічаються в природі, — опинів. Ці речовини не є причиною виникнення пухлин: вони синтезуються в пухлинній тканині, що вже утворилася. Пухлини починають синтез опинів у віці декількох днів, наприклад, на коланхоє синтез опинів починається на 7-й день з моменту індукції пухлин. Опини — похідні амінокислот, різних кетокислот і сахарів. Вони є біологічно активними з'єднаннями нового типу, що виявляються тільки в тканинах корончатих галлів у рослин, тому їх можна розглядати як біохімічні маркери для кліток корончатих галлів. Опини служать живильною речовиною для агробактерій, проте пухлини продовжують продукувати ці з'єднання і в стерильних культурах, що не містять агробактерій. Відомо три типи опинів: нопалин, октопин і атропін. Одні штами бактерій індукують октопинпродуцируючі пухлини, інші нопалинпродуцируючі.

Отже, перша загальна властивість «звиклих» і пухлинних тканин, що індукуються агробактеріями, полягає в гормонезалежності, пов'язаній з придбанням здатності інтенсивно синтезувати гормони. У головних пухлинах така здатність виникає в результаті перенесення чужорідного гена з бактерійної клітки в рослину. У клітках хімічних пухлин («звиклих» тканинах) ця ж властивість зв'язана, як вважають, з депресією генів, що відповідають за синтез гормонів, проте воно може бути зв'язане і з мутаціями.

Друга загальна властивість, яка витікає з першого, - втрата здатності «звиклих» і пухлинних кліток, що індукуються

агробактеріями, регенерувати фертильні рослини. Галові пухлини в переважній більшості випадків не здібні до регенерації нормальної рослини. Іноді вони утворюють тератоми (потворні органоподібні структури), які не можуть розвиватися нормально.

«Звиклі» тканини зазвичай також не регенерують нормальних рослин, їх клітки втрачають здібність до вторинного диференціювання і морфогенезу. Проте в деяких випадках, варіюючи склади живильних середовищ, вдається відсунути поріг «звикання». Отже, є резерв, використання якого дозволить отримувати рослини-регенеранти зі все більш тривало страхованих тканинних культур.

2.11 Культура клітинних суспензій

Суспензію кліток можна отримати з каллусу, помістивши його в рідке живильне середовище з автоматичним перемішуванням. Використовуючи фермент, наприклад пектиназу, отримуємо суспензійну культуру безпосередньо з тканини експланта (лист, стебло, корінь і т. д.). Спочатку на поверхні експланта утворюється калусна тканина, а потім вже від неї відділяються клітки і клітинні агрегати, внаслідок чого виходить клітинна суспензія.

Для отримання 100 мл клітинної суспензії необхідно 2—3 г свіжіше за калусної тканину.

Необхідною умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування або струшування середовища. Якщо клітинна суспензія знаходиться в нерухомому стані, то ділення суспензійних клітин приводить до утворення калусної тканини.

Ділення суспензійних клітин підтримується за наявності ауксинів і цитокинінів, тобто тих гормонів, які необхідні для індукції і зростання калусних кліток. Таким чином, суспензійні культури представлені типовими калусними клітками, що володіють всіма властивостями, характерними для кліток такого роду.

Суспензії краще утворюються з рихлого каллусу, що отримується на середовищах з 2,4-Д. Виключення з живильного середовища іонів кальцію полегшує суспендування. Ще більш

полегшує цей процес додавання в середу ферменту пектинази, який руйнує пектат кальцію, що склеює окремі клітки.

Клітинні суспензії в біотехнології використовуються для отримання вторинних метаболітів, багато хто з яких є цінними лікарськими препаратами, для промислового вирощування клітинної біомаси і для клітинної селекції. Разом з цим, суспензії кліток можна застосовувати як початковий матеріал для отримання ізольованих протопластів.

При використанні суспензійних культур як продуценти вторинних речовин застосовують закриті або відкриті системи ферментів в періодичному або проточному режимах вирощування кліток. У закритій системі клітинна суспензія позбавлена притоки свіжій живильного середовища до кінця вирощування, а у разі безперервного режиму вирощування у відкритій системі живильне середовище міняється на свіже. Як при періодичному, так і при проточному режимах вирощування у відкритій системі клітки залишаються в живильному середовищі і не віддаляються навіть при її заміні. Проте у відкритих системах культивування при заміні живильного середовища (періодичному або безперервному) разом з середовищем відбирається і частина суспензійних кліток.

Для роботи з клітинними суспензіями необхідно знати їх характеристики: життєздатність, щільність кліток в суспензійній культурі, ступінь агрегированності, швидкість росту.

Життєздатність кліток визначають по їх фарбуванню фарбником (метиленова синь або синь Еванса). Живі клітини не забарвлюються фарбником унаслідок непроникності для нього клітинних мембран. У мертві клітки фарба легко проникає, і вони забарвлюються в синій колір.

Одним з основних показників, що характеризують стан клітинної суспензії, є щільність клітинної популяції. Число кліток визначають в рахунковій камері Фукса—Розенталя під мікроскопом після мацерації (розділення кліток). Як речовина, що мацереує, застосовують хромову кислоту (10—20 %), яка гідролізує середні пластинки, що сполучають клітки.

Суспензія, що добре росте, має, як і каллусна культура, зобразну криву зростання. Зазвичай тривалість пасажу складає

14—16 днів. При цьому щільність зростає від $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ клітин/мл. Суспензія для субкультивування береться в кінці експоненціальної фази. Збільшення числа кліток, їх сирової і сухої маси — основні критерії зростання суспензійних культур.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегації її кліток. Агрегати не повинні містити більше 10—12 кліток. Тому, щоб позбавитися від крупних агрегатів, суспензії фільтрують через марлевих, нейлонові або металеві фільтри. Одночасно це дозволяє звільнитися від залишків експланта або щільних шматків каллусної тканини.

Для промислового отримання продуктів вторинного синтезу з великих клітинних мас використовують ферментери великої ємкості (від 20 000 і більше літрів), в яких проводять безперервне культивування кліток. Найбільш поширеним режимом глибинного культивування клітинних суспензій є закрита періодична система. Для аерації і перемішування суспензії використовують гойдалки, ролерів, ферментери з механічними і магнітними мішалками або ферментери, де аерація і перемішування здійснюється повітряним потоком.

Суспензійні культури можуть бути не тільки джерелом цінних вторинних метаболітів, але в них виявлені також нові незвичайні з'єднання, наприклад, камптотецин, харингтонин і інші антиканцерогенні, пептиди (інгібітор протеаз, інгібітор фітовірусів) і ін.

Слід зазначити, що ділення клітин, що приводить до збільшення клітинної біомаси, і синтез вторинних метаболітів роз'єднані в часі. Синтез вторинних метаболітів досягає максимуму в стаціонарній фазі зростання.

2.12 Культура поодиначних клітин

Для генетичних і фізіологічних досліджень, а також для практичного використання в клітинній селекції дуже цінним є культивування окремих кліток. Отримання клона потомства одиночної клітки допомагає розібратися в причинах генетичної неоднорідності калусних кліток, оскільки спостереження в даному випадку проводяться на тканині, отриманій не з гетерогенного експланта, а з однієї клітки.

Одиночна гібридна клітка, виділена з культури ізольованих протопластів, при подальшому її діленні дозволяє отримати клон, що складається з гібридних кліток. Це набагато полегшує роботу дослідника, оскільки усуває необхідність відбору потомства в культурі ізольованих протопластів від негібридних, що представляє значні труднощі. Крім того, сам процес соматичної гібридизації краще спостерігати, якщо робота ведеться з одиночними протопластами.

Виділяють одиночні клітки з клітинних суспензій, з тканин рослин, наприклад, з мезофілу листа після його мацерації ферментами, з культури ізольованих протопластів після відновлення клітинної стінки.

Для отримання одноклітинної фракції суспензійної культури іноді достатньо простого відстоювання в колбі протягом 15—30 мін. При цьому крупні агрегати осідають на дно колби, а надосадова фракція містить тільки одиночні клітки або дрібні агрегати. У тому випадку, коли при відстоюванні не вдається отримати одноклітинну фракцію, застосовують ферменти, що мацерують, центрифугування в градієнті сахарози або фільтрування через сита (нейлонові або металеві).

Труднощі культивування одиночних кліток пов'язані з тим, що окрема клітина не ділиться в тих умовах, в яких добре росте калусна тканина. Для того, щоб змусити одиночні клітки ділитися, розроблені спеціальні методи. У 1960 р. Джонсон запропонував метод «няньки», при якому функцію «няньки», стимулюючої ділення одиночної клітки, виконують шматочки

калусної тканини, відокремлені від неї фільтрувальним папером. У присутності «няньки» одиночна клітина

ділиться і дає індивідуальну колонію кліток — клон.

Інший метод заснований на використанні дуже малих об'ємів багатого живильного середовища і є культивуванням одиночних кліток в мікрокраплі в чашці Купрака об'ємом 20 мкл. Метод запропонований академіком Ю.Ю. Глебой. У мікрокраплях зручно спостерігати за отриманням і діленням клітин при соматичній гібридизації.

Для індукції клітинних ділень у одиночній клітці можна використовувати також «годуєчий шар» (клітки суспензійної культури того ж виду рослин, що активно діляться, що і одиночна клітка) (мал. 2.3). Стимулює клітинне ділення і кондиціювання середовища, для чого в неї додають живильне середовище від культури кліток, що інтенсивно діляться. кондиціюючий чинник отримують при фільтруванні клітинної суспензії в експоненціальній фазі зростання через бактерійний фільтр. По суті справи всі перераховані методи засновані на використанні виділень з кліток, що діляться, — кондиціюючого чинника.

Рис. 2.3
Використання
у якості
«няньки»
культури
суспензійних
клітин при
виращуванні
ізолюваних
протопластів
та одиночних
клітин:



1 – колонії клітин, 2 – фільтрувальний папір, 3 – алюмінієва сітка, 4 – поліуретан, 5 – суспензія клітин.

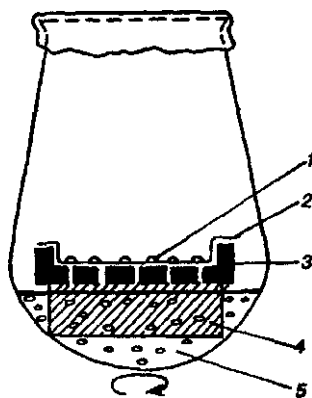


Рис. 2.4. Типи
в культурі калусної тканини

морфогенезу

2.13.Морфогенез

Існує декілька шляхів, по яких може йти розвиток клітини після її дедиференційовки. Перший шлях — це вторинна регенерація цілої рослини, можлива диференційовка рівні кліток, тканин, органів. Другий шлях — це втрата кліткою здібності до вторинного диференціювання і регенерації рослини, стійка диференційовка, придбання здатності рости на середовищі без гормонів, тобто перетворення на пухлинну.

Такими властивостями часто характеризуються клітки старих пересадкових культур. Третій шлях — це старіння ,нормальний цикл розвитку калусної клітини. В цьому випадку клітка зазнає вторинне диференціювання і припиняє ділитися (стаціонарна фаза зростання). Проте таке диференціювання не веде до морфогенезу, а закріплює за нею властивості старої калусної клітки.

Для сільськогосподарської біотехнології найбільший інтерес представляє регенерація в культурі тканин з окремої клітки цілої рослини. Іноді цей шлях лежить через утворення окремих органів .У культурі калусних тканин морфогенезом називають

виникнення організованих структур з неорганізованої маси кліток. Існує два основні типи морфогенезу (мал. 2.4). У культурі тканин він може виявлятися у вигляді органогенезу (утворення монополярної структури, тобто окремих органів): кореневого, стеблового, рідше флорального (квіткового) або листового, а також у вигляді соматичного ембріогенезу (утворення біполярних зародишеподібних структур з соматичних кліток). У разі органогенезу спочатку регенерують окремі органи, а потім вже з них — цілі рослини, виняток становить кореневий органогенез.

В результаті соматичного ембріогенезу на відміну від органогенезу відразу утворюється зародок, що має як меристему кореня, так і меристему верхівкової нирки, з якого надалі розвивається ціла рослина.

Здатність окремої соматичної клітки повністю реалізувати свою програму розвитку і давати почало цілому рослинному організму називають тотипотентністю рослинної клітки. Будь-яка рослинна клітка володіє однаковими потенційними можливостями, оскільки містить весь набір генів і, отже, клітки зберігають властиву зиготі програму розвитку. Тому якщо ми отримуємо каллус з кліток пелюстки квітки, або з кліток серцевинної паренхіми стебла, або з клітин будь-якої тканини, то в принципі кожна така клітка може регенерувати цілу рослину. Проте властивість тотипотентності не завжди реалізується, так, як потенційні можливості кліток різних типів виявляються неоднаково. У деяких з них гени в сильному ступені репресовані, у зв'язку з чим прояв тотипотентності стає обмеженим.

Ідея про тотипотентність рослинної клітки була висунута Г. Хаберландтом ще в 1902 р., хоча і не отримала тоді експериментального підтвердження. Згідно визначенню Хаберландта, будь-яка клітка рослини може дати початок новому організму, і якщо цього не спостерігається, то тільки тому, що рослинний організм пригнічує потенції клітки. Клітинну основу морфогенезу складає цитодифференційовка. Регенерація рослини починається з вторинною дифференційовки кліток. При цьому дифференційовані клітки знов набувають структури і функцій спеціалізованих.

Вторинне диференціювання калусних кліток не завжди закінчується морфогенезом і регенерацією рослини. Іноді вона приводить тільки до утворення тканин (гистодифференційовка). Таким шляхом калусна клітка може перетворюватися на флоємні або ксилемні елементи. Іншим прикладом вторинного диференціювання може служити перетворення дифференційовки активно проліферируючі клітини в стару некалусну клітку, що ділиться (стаціонарна фаза зростання).

Зі всіх видів вторинного диференціювання найбільший інтерес представляє морфогенез, оскільки він дозволяє отримувати цілу рослину з калусної клітки.

У основі диференціювання і морфогенезу лежить послідовне включення різних генів, тобто диференціювання кліток визначається диференціальною активністю генів. Зміна активності структурних генів може бути пов'язане з їх дерепресією, репресією або ампліфікацією (множенням). Велику роль в цьому процесі грають фітогормони.

Морфогенезом в культурі калусних тканин можна управляти. На здібність ізолюваних рослинних кліток до морфогенезу роблять вплив як внутрішні, так і зовнішні чинники. До внутрішніх чинників відносяться: видова приналежність початкової рослини, орган, з якого узятий експлант, вік експланта. До зовнішніх чинників перш за все відносяться: склад живильного середовища, температура, світло (інтенсивність і довжина фотоперіоду).

Найбільш могутнім індуктором морфогенезу, який прийнято називати стимулом або сигналом морфогенезу, є зміна співвідношення між цитокинінами і ауксинами, що входять до складу живильних середовищ. При переважанні цитокинінів над ауксинами часто починається стебловий органогенез, а у разі переважання ауксинів над— цитокинінами кореневий (рис. 1.5). Слід зазначити, що з тих, що утворюються в культурі калусної тканини коріння майже ніколи не регенерується ціла рослина, а при стебловому органогенезі спочатку утворюється втеча, яка потім (при пересадці на середовище з переважанням ауксинів) укорінюється і дає початок цілій рослині. Таким чином, відмінності в балансі екзогенних гормонів ауксинового і

цитокінінового типу визначає, з одного боку, можливість переходу клітки в культурі до дедифференційовки і неорганізованої проліферації, а з іншої — індукцію вторинного диференціювання того або іншого типу морфогенезу, що було відмічене Ф. Ськугом і Е. Міллером (1957). Отже, ауксини і цитокиніни, зухвалі в залежності від співвідношення або дедифференційовки і перехід до калусного зростання, або диференціювання і морфогенез в культурі калусних тканин, є не тільки регуляторами зростання, але і регуляторами.

Якщо органогенез можна індукувати за допомогою ауксинів або цитокинінів, то соматичний ембріогенез фактично незалежний від екзогенних фітогормонів. Зазвичай ембріогенні зони виникають в калусній тканині на тому ж живильному середовищі, яке використовувалося для калусоутворення. Розвиток соматичних зародків в калусній тканині починається тоді, коли усувається дедифференціюючий чинник з живильного середовища (2,4-Д або інші ауксини). Зародок, що розвивається, не потребує екзогенних гормонів, оскільки сам забезпечує себе ними.

Незалежність соматичного ембріогенезу від гормонів є аргументом на користь точки зору, висловленої ще Хаберландтом, а пізніше Стевардом, що сам процес ізолювання клітки стимулює реалізацію її тотипотентності, тобто перехід до морфогенезу. Таким чином, основними стимулами морфогенезу є зміни співвідношення гормонів в живильному середовищі, а також сам процес ізоляції рослинної клітки від організму.

Додатковими стимулами морфогенезу в культурі калусних тканин є присутність в живильному середовищі нітрату срібла, нітрату амонія, деяких амінокислот (пролін, Тирозин, іноді серин), поліамінів (путресцин і спермидин). У ряді випадків стимулюють процес морфогенезу маніт і сорбіт. Іони роблять вплив на розвиток виниклих в калусній тканині організованих структур, а їх індукцію стимулюють інші іони. Гіберелова кислота стимулює зростання зачатків стебла, а абсцизова прискорює диференціювання органів соматичних зародків.

Цікаво відзначити, що деякі з перерахованих речовин, наприклад, нітрат срібла, продовжують регенераційну здатність в старих пересадкових культурах.

Під впливом того або іншого стимулу морфогенезу каллусна клітка повинна стати детермінованою, проте не всі клітки, а лише одна з 400—1000 стає на шлях регенерації. Отже, для переходу до морфогенезу недостатньо індуктора (стимулу), а необхідно, щоб клітка була готова до відповіді на нього. Здатність сприймати стимули морфогенезу називають компетентністю клітки. Дослідники прийшли до висновку, що компетентність кліток — подія випадкове і тому таке рідкісне. У зв'язку з цим напрошується питання про долю тих каллусних кліток, які в силу некомпетентності не здатні сприйняти стимули морфогенезу і детермінуватися. У пересадковій культурі ці клітки продовжують ділитися і швидше за все стають на шлях переходу до гормоннезалежності. Проте не всі каллусні тканини з часом завершують розвиток виникненням гормоннезалежності. Багато з них через генетичні особливості продовжують використовувати екзогенні гормони, але повністю втрачають здатність до регенерації. Такі тканини займають проміжне положення між «звиклі» і свіжі каллусними тканинами.

Морфогенез в каллусної тканині починається з того, що під впливом відповідних умов детермінована клітка відособлюється від тих, що оточують її каллусних кліток, утворюючи потовщену клітинну стінку. Це явище було виявлене в 1972 р. Даніліної при вивченні соматичного ембріогенезу в культурі тканини моркви.

Клітина-ініціаль при соматичному ембріогенезі дає початок зиготі, а при органогенезі — меристематичному вогнищу. Від недетермінованих каллусних кліток ініціальна відрізняється крупнішим ядром і меншими розмірами вакуолей. Ядро зазвичай займає центральне положення. У ініціальних клітках містяться великі кількості запасних речовин: крохмалю, іноді — ліпідів.

Якийсь час ініціальні клітини знаходяться в лаг-фазі, що необхідне для їх перебудови і підготовки до подальших швидких ділень. Потім ці клітини діляться за типом дроблення, утворюючи сферичну масу дрібних ізодіаметричних кліток. У разі органогенезу

цю масу кліток називають меристематичним вогнищем, а у разі соматичного ембріогенезу — глобулярним проембрію. Надалі в меристематичном вогнищі диференціюються зачатки стебла, кореня, листа або квіткової нирки і відповідно відбувається стебловий, кореневий, листовий або флоральний органогенез. У глобулярному проембрію розвивається біполярна ембріоїдна структура. Можна виділити декілька послідовних стадій формування соматичних ембріоїдів з калусної клітини: глобулярну, сердечка, торпедовидну, соматичного зародка. Меристематичні вогнища або проембріюда можуть виникати на периферії калусної тканини або бути зануреними в неї. Зазвичай не спостерігається певної закономірності в їх локалізації. Виняток становить стебловий органогенез в калусної тканині, отриманій з серцевинної паренхіми тютюну сорту Вісконсін-38. Меристематичні вогнища тут завжди локалізуються тільки в нижній частині калусної маси.

Під час переходу калусних кліток до морфогенезу відбувається істотна зміна їх метаболізму. Морфогенезу передують поява в клітках білків-антигенів. Роботами Р.Г. Бутенко, Н.І. Володарського і Н.А. Моїсєєвой показано, що морфогенез в культурі калусних тканин тютюну характеризується включенням і виключенням синтезу певних білків-маркерів. У меристемах виявлено два білки-антигени, які є маркерами цих кліток. Одночасно показано, що індукована детермінація клітин калусної тканини зв'язана.

Білок (глікопротеїд), виділений з ембріогенних культур, можна розглядати, як конденсуючий чинник. При частих пересадках на свіже живильне середовище, де глікопротеїд накопичуватися не може, ембріогенез не йде. Якщо білок, що з'являється в клітках при переході до соматичного ембріогенезу, виділити і ввести в довгі (неембріогенні) калусні клітки, у яких гени морфогенезу не працюють або втрачені, то в них індукується перехід до морфогенезу.

Роботи по пошуку нових маркерів морфогенезу продовжуються. Клітки меристематичних вогнищ і клітки, що дають початок ембріоїдним структурам, відрізняються від калусних інтенсивним синтезом РНК і ДНК, що пов'язане з особливостями їх білкового обміну. Зміни в білковому обміні схожі з тими, які протікають при дедифференційовці клітки, але підсумки у них різні. На думку Р. Р.

Бутенко, специфіка реакції визначається не загальним посиленням синтезу макромолекул, що необхідне для посиленої проліферації, а тими унікальними синтезами, які йдуть на цьому загальному фоні і обумовлюють появу білків регуляторного типу.

Перехід до морфогенезу в культурі калусних тканин супроводжується значними змінами дихального метаболізму. В цілому дихання (по CO_2) посилюється, але змінюється його характер у напрямі інтенсифікації пентозофосфатного шляху. Зростає активність дихальних ферментів.

За біохімічною - настає структурна реорганізація клітини. Біохімічне диференціювання клітини завжди передують структурним. У клітинах, які вступили на шлях морфогенезу, зростає число рибосом, мітохондрій, змінюється їх внутрішня структура.

Процеси морфогенезу в калусних клітинах протікають асинхронно і тривало. Одночасно в калусній тканині можуть бути як повністю сформовані структури, так і клітки, що тільки що вступили на цей шлях.

Підвищена синтетична активність кліток меристематичного вогнища і глобулярного проембріодів робить їх атрагівним центром, в який спрямовуються живильні речовини. Навколишні калусні клітини при цьому часто руйнуються і ембріоди, що утворюються, легко випадають з маси калусних кліток.

Калусні клітини не зв'язані між собою плазмодесмами або останні сильно зредуковані. При появі зародишеподібних структур або меристематичних вогнищ між клітками знову відновлюється зв'язок за допомогою плазмодесм.

Всі зміни, що відбуваються при морфогенезі і закінчуються регенерацією з калусної клітини рослини, управляються (контролюються) спеціальними генами. В даний час одні учені вважають, що ознака морфогенезу полігенна і контролюється декількома хромосомами, інші прийшли до висновку, що ця ознака визначається двома ядерними генами. Той факт, що морфогенетична активність калусних кліток має генетичну природу, пояснює, чому не вдається у ряді випадків отримати регенерацію з калусної тканини тих або інших генотипів. Регенераційну здатність може збільшити схрещування генотипів, морфогенетично активних *in vitro*.

Контрольні запитання:

1. Охарактеризуйте калусні клітини.
2. Чим відрізняються пухлини від калусів?
3. За яких умов протікають процеси морфогенезу?
4. Яким чином можна відкоригувати процес утворення калусів?
5. Від чого залежить успіх утворення калусів?

Тема 3 Клональне мікророзмноження рослин

3.1. Умови клонального мікророзмноження

Для насінних рослин характерний два способи розмноження: насінний і вегетативний. Обидва ці способу мають як переваги, так і недоліки. До недоліків насінного розмноження слід віднести, в першу чергу, генетичну строкатість отриманого посадочного матеріалу і тривалість ювенільного періоду. При вегетативному розмноженні зберігається генотип материнської рослини і скорочується тривалість ювенільного періоду. Проте для більшості видів (в першу чергу для деревних порід) проблема вегетативного розмноження залишається до кінця не вирішеною. Це обумовлено наступними причинами: 1) не всі породи, навіть на ювенільній стадії, можуть розмножуватися вегетативним способом з необхідною ефективністю (дуб, сосна, ялина, горіхоплідні і ін.); 2) практично неможливо за допомогою черенкування розмножувати багато видів деревних порід у віці старше 10—15 років; 3) не завжди вдається отримувати стандартний посадочний матеріал (можливість накопичення і передачі інфекції); 4) трудомісткістю і складністю операцій при розмноженні дорослих (деревинних) рослин за допомогою щеплень; 5) неефективністю розроблених технологій для отримання достатньої кількості генетично однорідного матеріалу протягом року.

Досягнення в області культури кліток і тканин привели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження — клонального мікророзмноження (отримання в умовах *in vitro* (у пробірці), нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних початковому екземпляру). У основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітки реалізовувати властиву нею тотипотентність, тобто під впливом екзогенних дій давати почало цілому рослинному організму. Цей метод, поза сумнівом, має ряд переваг перед існуючими традиційними способами розмноження:

- отримання генетично однорідного посадочного матеріалу;
- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемної культури;

— високий коефіцієнт розмноження (105— 106 — для трав'янистих, квіткових рослин, 104— 10я — для чагарникових деревинних, 104 — для хвойних);

— скорочення тривалості селекційного періоду;

— прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;

— розмноження рослин, що важко розмножуються традиційними способами;

— можливість проведення робіт протягом круглого року і економія площ, необхідних для вирощування посадочного матеріалу;

— можливість автоматизації процесу вирощування. Перші досягнення в області клонального мікророзмноження були отримані в кінці 50-х років нашого сторіччя французьким ученим Жоржем Морелем, якому вдалося отримати перші рослини-регенеранти орхідей. Успіху Ж. Мореля в мікророзмноженні сприяла вже розроблена на той час техніка культивування апікальної меристеми рослин в умовах *in vitro*. Як правило, дослідники як первинного експланта використовували верхівкові меристеми трав'янистих рослин: гвоздики, хризантеми, соняшнику, гороху, кукурудзи, кульбаби, салату і вивчали вплив складу живильного середовища на процеси регенерації і формування рослин. Ж. Мореля в своїх роботах також використовував верхівку цимбидіума (сем. орхідні), що складається з конуса наростання і двох-трьох листових зачатків, з якої за певних умов спостерігав утворення сферичних сфер — протокормів. Протокорми, що сформувалися, можна було ділити і потім культивувати самостійно на знов приготованому живильному середовищі до утворення листових примордіїв і коріння. В результаті їм було виявлено, що цей процес нескінченний і можна отримувати у великій кількості високоякісний і генетично однорідний, безвірусний посадочний матеріал.

У нашій країні роботи по клональному мікророзмноженню були початі в 60-х роках в лабораторії культури тканин і морфогенезу Інституту фізіології рослин ім. К.А. Тімірязєва РАН. Під керівництвом проф. Р.Г. Бутенко були вивчені умови мікророзмноження картоплі, цукрового буряка, гвоздики, гербери,

фрезії і деяких інших рослин і запропоновані промислові технології.

Таким чином, перші успіхи в клональному мікророзмноженні пов'язані з культивуванням апікальних меристем трав'янистих рослин на відповідних живильних середовищах, що забезпечують зрештою отримання рослин-регенерантів.

Проте область застосування мікророзмноження різноманітна і має тенденцію до постійного розширення. Це в першу чергу відноситься до розмноження *in vitro* дорослих деревних порід, особливо хвойних, і використання техніки *in vitro* для збереження рідкісних і зникаючих видів лікарських рослин. В даний час в цьому напрямі намітилося позитивне зрушення.

Перші роботи по культурі тканин деревних рослин були опубліковані в середині 20-х років нашого сторіччя і пов'язані з ім'ям французького ученого Готре. У них повідомлялося про здатність камбіальних тканин деяких видів в'яза і сосни до каллусогенезу *in vitro*. У подальших роботах 40-х років було з'ясовано про здатність різних тканин в'яза листового до утворення адвентивних нирок. Проте подальше зростання і формування втеч авторами не були отримані. Лише до середини 60-х років Матесу вдалося отримати перші рослини-регенеранти осики, які були доведені до ґрунтової культури. Культивування тканин хвойних порід *in vitro* довгий час використовувалося як об'єкт дослідження. Це було пов'язано із специфічними труднощами культивування ювенільних і тим більше дорослих тканин, ізольованих з рослини. Відомо, що деревинні, і особливо хвойні, характеризуються повільним зростанням, важко укорінюються, містять велику кількість вторинних з'єднань (феноли, терпени і інші речовини), які в ізольованих тканинах окислюються різними фенолазами. У свою чергу, продукти окислення фенолів звичайне інгібують ділення і зростання кліток, що веде до загибелі первинного експланта або до зменшення здатності тканин деревних порід до регенерації адвентивних нирок, яка з віком рослини-донора поступово зникає повністю. Проте, не дивлячись на всі труднощі, учені все частіше використовують як об'єкти досліджень різні тканини і органи деревних рослин. В даний час налічується більше 200 видів деревних рослин з 40 сімейств, які були

розмножені *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осика, гібриди тополь з осикою, сосна, ялина, секвоя і ін.), а роботи в цьому напрямі ведуться в наукових установах Москви, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфи, Новосибірська, Архангельська, Києва, Одеси, Ялти і ін.

5.2. Етапи і методи клонального мікророзмноження рослин

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи: 1 — вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання стерильної культури, що добре росте; 2 — власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості мериклонів; 3 — вкорінення розмножених втеч з подальшою адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2°, +10° С); 4— вирощування рослин в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або посадки в полі.

Існує багато методів клонального мікророзмноження. Різні автори, проводячи індивідуальні дослідження по впливу умов культивування експлантів на процеси морфогенезу, спостерігали різні у відповідь морфогенетичні реакції на зміну умов вирощування, що у свою чергу привело до створення нових класифікацій методів клонального мікророзмноження. Виходячи із запропонованих в літературі методів мікророзмноження рослин, цей процес можливо здійснювати наступними шляхами:

- активація розвитку меристем, що вже існують в рослині (апекс стебла, нирки пазух і сплячих стебла);
- індукція виникнення адвентивних нирок безпосередньо тканинами експланта;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних нирок в первинній і пересадковій калусній тканинах.

Основний метод, використовуваний при клональному мікророзмноженні рослин, - це активація розвитку меристем, що вже існують в рослині, що ґрунтується на знятті апікального домінування. Це може бути досягнуто двома шляхами: а)

видаленням верхівкової меристеми стебла і подальшим мікрочеренкуванням втечі *in vitro* на безгормональному середовищі; б) додаванням в живильне середовище речовин цитокинінового типу дії, що індукують розвиток численних втеч пазух. Цитокининів використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфури-ламінопурин (кinitін), а також 2-ізопентениладенин і зеатин. Отримані таким чином втечі відокремлюють від первинного материнського експланта і знов самостійно культивують на свіжо приготованому живильному середовищі, стимулюючи проліферацію пазух меристем і виникнення втеч вищих порядків. В даний час цей метод широко використовується у виробництві безвірусного посадочного матеріалу сільськогосподарських культур, як технічних (цукровий буряк, хміль, тютюн, топінамбур), так і овочевих (томати, картопля, огірок, перець, гарбуз, спаржа і ін.), а також для розмноження культур промислового квітникарства (гвоздика, хризантема, троянда, гербера), тропічних і субтропічних рослин (рододендрон, азалія, камелія, чай і ін.), плодових і ягідних культур (яблуня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, агрус і ін.) і деревних рослин (тополя, верба, вільха, береза, горобина, секвоя, туя, ялівець і ін.) Для деяких сільськогосподарських культур, таких, як картопля, технологія клонального мікророзмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активації розвитку меристем, що існують в рослині, дозволяє отримувати з однієї меристеми картоплі більше 1010 рослин в рік, причому технологія передбачає отримання в пробірках мікроклубнів—цінного, безвірусного насінного матеріалу.

Другий метод—це індукція виникнення адвентивних нирок безпосередньо тканинами експланта. Він заснований на здатності ізольованих частин рослини за сприятливих умов живильного середовища відновлювати бракуючі органи і, таким чином, регенерувати цілі рослини. Утворення адвентивних нирок можна добитися майже з будь-яких органів і тканин рослини (ізольованого зародка, листа, стебла, сім'ядолю, лусочок і донця цибулини, сегментів коріння), якщо їх вдається отримати вільними від інфекції. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, що містять один цитокинін або у поєднанні з

ауксином, знаходяться в співвідношенні 10:1 або 100:1. Як ауксин в цьому випадку найчастіше використовують Я-індолил-3-оцитову кислоту (ІУК) або α -нафтилоцитову кислоту (НУК). Це найбільш поширений метод мікророзмноження вищих рослин, яким було розмножено багато цибулинних квіткових рослин (нарциси, лілії, гіацинт, гладіолуси, тюльпани) з цибулинних чешуй, сегментів базальної частини донця цибулин, експлантів листя; представники роду Brassica (капуста кольорова, качанова, брюссельська, листовая, броколі) — з сегментів гіпокотилля, сім'ядолею, листя; лук, часник — з верхівкової меристеми, тканини, донця цибулин; томати — з апікальних або пазух меристем; салат цикорний — з сегментів листових платівок; петунія — з сегментів коріння; глоксинія, фіалки — з сегментів листових пластинок, а також деякі представники деревних рослин — з ізольованих зрілих і незрілих зародків

Формування ембріодів в культурі тканин відбувається в два етапи. На першому етапі клітки експланта диференціюються за рахунок додавання в живильне середовище ауксинів, як правило, 2,4-дихлорфеноксиоцетової кислоти (2,4-Д) і перетворюються на ембріональних. На наступній стадії необхідно змусити клітки, що сформувалися, розвиватися в ембріоди, що досягається шляхом зменшення концентрації ауксину або повного його виключення з складу живильного середовища. Соматичний ембріогенез можливо спостерігати безпосередньо в тканинах первинного експланта, а також в калусної культурі. Причому останній спосіб менш придатний при клональному мікророзмноженні, оскільки посадочний матеріал, отриманий таким методом, буде генетично нестабільний по відношенню до рослини-донора. Як правило, соматичний ембріогенез відбувається при культивуванні калусних кліток в рідкому живильному середовищі (суспензія) і є найбільш трудомісткою операцією, оскільки не завжди вдається реалізовувати властиву кліткам тотипотентність. Проте цей метод розмноження має свої переваги, пов'язані з скороченням останнього (третього) етапу клонального мікророзмноження, що не вимагає підбору спеціальних умов вкорінення і адаптації пробірних рослин, оскільки соматичні зародки є повністю сформовані рослини. При використанні

відповідної техніки їх капсулювання з цих ембріодів можливо отримувати штучне насіння.

Четвертий метод клонального мікророзмноження — диференціація адвентивних нирок в первинній і пересадковій калусній тканині. Практично він мало використовується в цілях отримання посадочного матеріалу *in vitro*. Це пов'язано з тим, що при періодичному пересаджуванні калусній тканини на свіже живильне середовище часто спостерігаються явища небажані при мікророзмноженні: зміна плодоїдності культивованих кліток, структурні перебудови хромосом і накопичення генних мутацій, втрата морфогенетичного потенціалу культованими клітками. Разом з генетичними змінами рослин спостерігаються і морфологічні: низькорослість, неправильне жилкування листя і їх розташування по стеблу, утворення укорочених, потовщених між вузлових, потворність, знижена стійкість до хвороб і шкідників. Причому тривале культивування калусних кліток посилює ці зміни, тому період неорганізованого зростання при мікророзмноженні повинен бути зведений до мінімуму.

Проте, не дивлячись на деякі недоліки, даний метод має свої позитивні сторони і переваги. По-перше, він є ефективним і економічно вигідним, оскільки в процесі розмноження з кожної індивідуальної калусної клітки за певних сприятливих умов культивування може сформуватися адвентивна нирка, що дає почало новій рослині. По-друге, у ряді випадків він є єдино можливим способом розмноження рослин в культурі тканин. По-третє, представляє великий інтерес для селекціонерів, оскільки рослини, отримані даним методом, розрізняються генетично і морфологічно. Це дає можливість селекціонерам проводити відбір рослин по господарсько-важливих ознаках і оцінювати їх поведінку в польових умовах. Цей метод доцільно приміняти лише до тих рослин, для яких показана генетична стабільність калусної тканини, а варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості. До таких рослин можна віднести амариліс, томати, спаржу, деякі деревні породи і інші культури. Через калусну культуру були розмножені: цукровий буряк, деякі представники роду *Brassica*, кукурудза, рис, пшениця і

інші злакові, соняшник, льон, розроблені умови, сприяючі регенерації рослин з каллусу огірка, картоплі, томатів.

Оздоровлення посадочного матеріалу від вірусів. Основна перевага клонального мікророзмноження — це отримання генетично однорідного, безвірусного посадочного матеріалу. Цього можливо досягти, використовуючи меристемні тканини апексів і нирок пазух органів стеблового походження. Як правило, меристема складається з конуса наростання, а також одного або двох листових зачатків (примордіїв) і є вільною від інфекції.

Припущення про можливість відсутності вірусів в меристематичних тканинах хворих рослин вперше висловлене Чунгом (1938) і П.Р. Уайтом (1943). Починаючи з 50-х років були зроблені перші успішні досліді по отриманню вільних від вірусів рослин жоржини з точки зростання. Автори цього методу Ж-Морея і С. Мартін вважали, що в хворій рослині вірус розповсюджується з відставанням від молодих органів, що швидко ростуть, особливо в молодих недиференційованих тканинах, де концентрація вірусу може знижуватися, аж до повної відсутності. Теоретичні концепції, покладені в основу цього методу, почали вияснюватися останнім часом.

Структурною основою використовуваного на практиці явища служить специфіка будови точки зростання рослин: дистальна її частина, представлена апікальною меристемою, у різних рослин має середній діаметр до 200 мкм і висоту від 20 до 150 мкм. У більш нижніх шарах клітки меристеми, що диференціюються, утворюють прокамбій, що дає почало пучкам провідної системи. Відомо, що успіх клонального мікророзмноження залежить від розміру меристематичного експланта, ніж більше листових зачатків і тканин стебла, тим легше йде процес морфогенезу, що закінчується отриманням цілої, нормальної пробірної рослини. Разом з тим зона, вільна від вірусних частинок, дуже різна для різних вірусів. Це залежить також від вигляду і сорту рослини. У деяких злаків, наприклад, розміри ділянки верхівки, що не містить судини, можуть досягати до 250 мкм. Така особливість будови апікальної меристеми виключає проникнення в неї вірусу шляхом швидкого транспортування по провідній системі, але допускає можливість повільного розповсюдження через плазмодесми,

сполучаючи меристематичні клітини при культивуванні апікальної меристеми картоплі величиною 200 мкм на живильному середовищі і подальше отримання з неї рослин-регенерантів показали, що серед отриманих рослин тільки 10% були вільні від Х-вірусу, але 70%—от У-вірусу.

Застосування електронної мікроскопії часто виявляє наявність вірусів в меристемі уражених ними рослин, це, втім, підтверджує загальновідомий факт, що кількість позбавлених вірусу рослин після подібної операції надзвичайно мало, і багато меристеми уражених рослин інфекціями..

Таким чином, ефективність застосування апікальної меристеми як метод оздоровлення заражених вірусами рослин виявляється низькою. Це було доведено результатами, що отриманими поряд меристемних лабораторій Російської Федерації і Криму, показують, що з апікальних меристем рослин гвоздики, цимбидіума, уражених вірусами CARMV і CARVMV, в умовах *in vitro* отримують інфіковані мериклони.

В принципі можливе отримання безвірусної апікальної меристеми від хворої рослини, але при цьому ризик попадання вірусів в здорові тканини повинен бути понижений до нуля. Це може бути досягнуто шляхом застосування попередньої термотерапії початкових рослин або хемотерапії.

Метод термотерапії застосовується як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* і передбачає використання сухого гарячого повітря. Для пояснення механізму звільнення рослин від вірусів в процесі термотерапії існують різні гіпотези. Згідно однієї з них, високі температури впливають безпосередньо на вірусні частинки через їх рибонуклеїнову кислоту і білкову оболонку, викликаючи фізичне руйнування і позбавляючи вірусні частинки інфекційної. Друга гіпотеза полягає в тому, що висока температура діє на віруси через метаболізм рослин. Під впливом високих температур порушується рівновага між синтезом і деградацією вірусних частинок. Якщо переважає синтез, то концентрація вірусу в заражених тканинах росте, і навпаки.

Рослини, що піддаються термотерапії, поміщають в спеціальні термокамери, де протягом першого тижня підвищують температуру від 25° до 37° з шляхом щоденного збільшення параметрів

температур на 2° С. Не менш важливо при термотерапії створювати і підтримувати впродовж всього процесу оптимальні режими: температуру 37° З, освітленість лампами денного світла 5 тис. люкс, фотоперіод залежно від культури 14—16 ч в добу при відносній вологості повітря в термокамері 90%.

Тривалість термотерапії цілком залежить від складу вірусів і їх термостійкості. Якщо, наприклад, для гвоздики достатньо 10—12-тижневої дії теплом, то для звільнення хризантеми від Б-віруса цей період триває 12 і більше тижнів. Проте існують рослини, наприклад, цибулинні культури, цимбидіум, троянди та інші, зростання яких пригнічується в результаті тривалої термотерапії *in vivo*. Для таких рослин доцільно проводити термотерапію рослин-ре- генерантів *in vitro*.

Крім позитивної дії термотерапії на звільнення рослин від вірусів, виявлений позитивний ефект високих температур на точку зростання і процеси морфогенезу деяких квіткових культур (гвоздики, хризантема, фрезії) в умовах *in vitro*. Застосування термотерапії дозволяє збільшити коефіцієнт розмноження на 50—60%, підвищити адаптацію пробірних рослин-регенерантів до ґрунтових умов, а також отримати вищий відсоток безвірусних маткових рослин.

Застосування термотерапії у поєднанні з меристемою культурою дозволяє оздоровити більше 70% рослин-регенерантів охмелівши від вірусного хлорозу, 90% рослин суниці, 25% — чорної і червоної смородини, 50% — малини, більше 80% — картоплі. Перевірку рослин на наявність вірусів, як правило, проводять за допомогою імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії і трав'янистих рослин-індикаторів.

Інший спосіб, вживаний для звільнення рослин від вірусів, - хемотерапія. Він полягає в додаванні в живильне середовище, на якому культивують апікальні меристеми, аналога гуанозина—1 β -Д-рибофуранозил-1,2,4-триа- злий-3-карбоксимид (комерційна назва вірозол) в концентрації 20—50 міліграм/л. Це противірусний препарат широкого спектру дії. При використанні вірозолу в культуральному середовищу відсоток безвірусних меристемних рослин для ряду звичайних для цих рослин вірусів збільшувався до 80—100% при 0—41% в контролі. Позитивні результати

хемотерапії були отримані для сливи, черешні, малини, деяких квіткових і інших рослин.

3.3. Техніка культивування рослинних тканин на різних етапах клонального мікророзмноження

Для культивування тканин на кожному з чотирьох етапів потрібне застосування певного складу живильного середовища.

І т а п . На цьому етапі необхідно добитися отримання стерильної культури, що добре росте. Це здійснюється шляхом стерилізації рослинних тканин ртуть вмісними розчинами (сулема, або діацид, 0,1—0,2%) або хлору, що отримують (хлорамін 10—15%-вий, гіпохлорит натрію або кальцію 5—10%-вий) протягом 5—10 хв. для ніжних, легко ушкоджуваних тканин рослин і 10—20 хв. — для тканин, що мають щільнішу оболонку. Після цього рослинні тканини необхідно ретельно промити в стерильній воді, що дистилує, як правило, в трьох порціях і перенести на приготоване заздалегідь стерильне живильне середовище. У тих випадках, коли важко отримати початкову стерильну культуру експланта, рекомендується вводити до складу живильного середовища антибіотики (тетрациклін, бензилпеніцилін і ін.) в концентрації 100—200 міліграм/л. Це в першу чергу відноситься до деревних рослин, у яких спостерігається тенденція до накопичення внутрішньої інфекції.

На першому етапі, як правило, використовують середовище, що містить мінеральні солі по рецепту Мурасіґа і Ськуґа, а також різні біологічно активні речовини і стимулятори зростання (ауксини, цитокиніни) в різних поєднаннях залежно від об'єкту. У тих випадках, коли спостерігається інгібування зростання первинного експланта, за рахунок виділення ним в живильне середовище токсичних речовин (фенолів, терпенів і інших вторинних з'єднань), зняти його можна використовуючи антиоксиданти. Це можливо двома способами: або обмивкою експланта слабким його розчином протягом 4—24 ч, або безпосереднім додаванням в живильне середовище. Як антиоксиданти використовують: аскорбінову кислоту (1 міліграм/л), глутатіон (4—5 міліграм/л), дітіотриетол (1—3 міліграми/л), диетилдитіо- карбонат (2—5 міліграм/л), полівінілпіролідон (5000—10000 міліграм/л). В деяких випадках

доцільно додавати в живильне середовище адсорбент — деревне активоване вугілля в концентрації 0,5—1%. Тривалість першого етапу може коливатися від 1 до 2 місяців, в результаті якого спостерігається зростання меристематичні тканин і формування первинних втеч.

II етап — власне мікро розмноження. На цьому етапі необхідно добитися отримання максимальної кількості мери клонів, враховуючи при цьому, що із збільшенням субкультивування збільшується число рослин-регенерантів з ненормальною морфологією і можливо спостерігати утворення рослин-мутантів. Як і на першому етапі, використовують живильне середовище по рецепту Мурасіга і Ськуга, що містить різних біологічно активних речовин, а також регулятори зростання. Основну роль при підборі оптимальних умов культивування експлантів грають співвідношення і концентрація внесених до живильного середовища цитокининів і ауксинів. З цитокининів найчастіше використовують БАП в концентраціях від 1 до 10 міліграма/л, а з ауксинів — ІУК і НУК в концентраціях до 0,5 міліграма/л. При довгому культивуванні рослинних тканин на живильних середовищах з підвищеним вмістом цитокинінів (5—10 міліграм/л) відбувається поступове накопичення їх в тканинах вище за необхідний фізіологічний рівень, що приводить до появи токсичної дії і формування рослин із зміненою морфологією. Разом з тим, можливо спостерігати такі небажані для клонального мікророзмноження ефекти, як придушення проліферації пазух меристем, утворення витрифіційованих (оводнених) втеч і зменшення здатності рослин до вкорінення. Негативну дію цитокининів можливо подолати, за даними Н.В. Катаєвой і Р.Г. Бутенко, шляхом використання живильних середовищ з мінімальною концентрацією цитокининів, що забезпечують стабільний коефіцієнт мікророзмноження, або шляхом чергування циклів культивування на середовищах з низьким і високим рівнем фітогормонів.

III—IV етапи — вкорінення мікрровтеч, їх подальша адаптація до ґрунтових умов і висадка в полі є найбільш трудомісткими етапами, від яких залежить успіх клонального мікророзмноження. На третьому етапі, як правило, міняють основний склад середовища:

зменшують в два, а іноді і в чотири рази концентрацію мінеральних солей по рецепту Мурасіґа і Ськуґа або замінюють її середовищем Уайта, зменшують кількість цукру до 0,5—1% і повністю виключають цитокиніни, залишаючи один лише ауксин. Як стимулятор корнеутворення використовують р-індолил-3-масляну кислоту (ІМК), ІУК або НУК. Вкорінення мікротеч проводять двома способами: 1) витримка мікротеч протягом декількох годинників (2—24 ч) в стерильному концентрованому розчині ауксину (20—50 міліграм/л) і подальше їх культивування на агаризованному середовищі без гормонів або безпосередньо у відповідному ґрунтовому субстраті (імпульсна обробка); 2) безпосереднє культивування мікротеч протягом 3—4 тижнів на живильному середовищі, що містить ауксин в невисоких концентраціях (1—5 міліграм/л залежно від досліджуваного об'єкту). Останнім часом запропонований поки метод вкорінення пробірних рослин, що мало практикується, — в умовах гідропоніки. Цей метод дозволяє значно спростити етап вкорінення і одночасно отримувати рослини, адаптовані до природних умов. Для картоплі можливо використовувати безсубстратну гідропоніку для отримання мінібульб. Затінювання нижньої частини культуральних судин щільною чорною матерією або додавання в живильне середовище активованого вугілля сприяє вкоріненню мікротеч.

Пересадка рослин-регенерантів в субстрат є відповідальним етапом, що завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливий час для пересадки пробірних рослин — весна або початок літа. Рослини з двома-трьома листям і добре розвинутою кореневою системою обережно виймають з колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним гачком. Коріння відмиває від залишків агару і висаджує в ґрунтовий субстрат, заздалегідь простерилізований при 85—90° С протягом 1—2 ч. Для більшості рослин як субстрати використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перлит (1:1:1); торф, пісок, перлит (1:1:1). Виняток становлять сімейство орхідних, для яких готують субстрат, що складається з сфагнового моху, суміші торфу, листя буку або дуба, соснової кори (1:1:1). Приготованим заздалегідь ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горщики, в яких вирощують рослини-регенеранти.

Горщики з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (20—22° С), освітленістю не більше 5 тис. лк і вологістю 65—90%. Для кращого зростання рослин створюють умови штучного туману. У тих випадках, коли немає можливості створити такі умови, горщики з рослинами накривають скляними банками або поліетиленовими пакетами, які поступово відкривають до повної адаптації рослин.

Через 20—30 днів після посадки добре укорінені рослини підготовують розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасига і Ськуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. У міру зростання рослин їх розсаджують у великі ємності зі свіжим субстратом. Подальше вирощування акліматизованих рослин відповідає прийнятій агротехніці вирощування для кожного індивідуального виду рослин. Процес адаптації пробірних рослин до ґрунтових умов є найбільш дорогою і трудомісткою операцією. Нерідко після пересадки рослин в ґрунт спостерігається зупинка в зростанні, опадання листя і загибель рослин. Ці явища зв'язані, в першу чергу, з тим, що у пробірних рослин порушена діяльність апарата, унаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не відбувається утворення корневих волосків, що приводить, у свою чергу, до порушення поглинання води і мінеральних солей з ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах клонального мікророзмноження застосовувати штучну микоризацію рослин (для мікотрофних), враховуючи їх позитивну роль в постачанні рослин мінеральними і органічними живильними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів. Існує два способи зараження рослин микоризообразующими грибами: 1) *in vitro* (у стерильних умовах), 2) *in vivo* (у природних умовах).

Перший спосіб сприятливіший, оскільки в цьому випадку виключається можливість забруднень ґрунту іншими мікроорганізмами. Крім того, в умовах *in vitro* є можливість контролювати умови культивування (світло, температура, вологість) і підбирати субстрат (рН, аерація), що забезпечує нормальне формування микоризи. Рослини, розмножені *in vitro*, розвиваються значно краще, якщо їх коренева система знаходилася у контакті з микоризоутворюючими грибами. В цьому випадку поліпшувалося постачання їх азотом, збільшувалася в 1,5—2 рази

приживаність рослин при їх пересадці в ґрунт, а також підвищувався приріст надземної біомаси. Такі роботи були проведені з березою, евкаліптом, каштаном, сосною, лохом і різними клонами вільхи.

Індійськими ученими запропонований простий метод запобігання швидкому обезводненню листя рослин, вирощених *in vitro*, під час їх пересадки в польові умови. Метод полягає в тому, що листя протягом всього акліматизаційного періоду слід обприскувати 50%-ним водним розчином гліцерину або сумішшю парафіну, або жиру в діетиловому ефірі (1:1). Застосування цього методу допомагає уникнути довгих і скрутних процесів ґартування пробірних рослин і забезпечує 100% їх приживаність.

У Інституті фізіології рослин ім. КА-Тімірязєва РАН розроблений спрощений спосіб адаптації пробірних рослин винограду. Він полягає в тому, що адаптацію рослини безболісно проходять в пробірках — для цього досить зняти пробки з тих пробірок, в яких рослини досягають пробки. У такому стані рослини залишають на 1,5—2 тижні. До кінця цього періоду верхівка рослини і два розвинені листочки з'являються над пробіркою і така рослина готова до пересадки в ґрунт. Рослини пересаджують в стерильний ґрунтовий субстрат разом з агаром для запобігання механічним пошкодженням кореневої системи. Втечу заглиблюють в ґрунтовий субстрат так, щоб над поверхнею залишалося стебло з одним-двома розвиненими листочками, не більш. Застосування цього способу для адаптації рослин винограду до ґрунтових умов дозволяє спростити і здешевити техніку акліматизації рослин. Це досягається унаслідок того, що в цьому випадку туман утворююча установка не використовується (А.Б. Бургутін, 1988).

Оптимізація умов клонального мікророзмноження рослин. Найважливіша умова успішного культивування ізолюваних кліток і тканин — збалансованість живильних середовищ по мінеральних солях, вуглеводах, фітогормонам і так далі. При введенні в культуру нового вигляду рослин дослідники нерідко випробовують велике число середовищ. Цей процес тривалий і часто не приносить належного результату.

Для визначення оптимального складу живильного середовища застосовують методи математичного планування експерименту, що дозволяють швидко при невеликому об'ємі експериментів визначити умови культивування, що забезпечують високу швидкість розмноження, вивчити залежність мікро розмноження від сукупності чинників, що діють на процес, а також встановити наявність і оцінити ефективність між факторних взаємодій. Залежно від поставленої мети експерименти проводять по повному або дробовому плану першого або другого порядку.

Успіх оптимізації залежить від того, наскільки правильно вибраний критерій оптимізації. На першому етапі мікро розмноження критерієм може служити кількісна оцінка будь-якої морфогенетичної реакції експланта, ведучій надалі до формування цілого рослинного організму. Наприклад, висота втечі, число тих, що диференціюються стеблових апексів, втеч, ембріоїдів. На другому етапі враховуються загальне число розвинутих втеч, ембріоїдів, яке повинне відображати ефективність розмноження. Критерієм оптимізації третього етапу може служити відсоток вкорінених рослин, довжина кореневої системи, число коріння на одну мікрівтечу. При цьому також необхідно враховувати висоту і загальний стан рослини і приживаність його при пересадці в ґрунт.

Математичне планування необхідно починати з вибору чинників, що діють на процес ($X_1, X_2, X_4 \dots$ і т. д.), що вивчається, їх граничних значень (верхній і нижній рівні) і схеми експерименту (матриці). Після чого проводять відбір експлантів, використовуваних в експерименті. При цьому необхідно враховувати неоднорідність початкового рослинного матеріалу і гетерогенність культивованих тканин. Тому рослинний матеріал необхідно рівномірно розподіляти між різними варіантами експерименту. Оптимальні умови культивування повинні забезпечити задовільне зростання всіх експлантів.

Обробку результатів багатофакторних експериментів проводять статистично і для отримання рівнянь регресії розраховують наступні показники: 1) коефіцієнт регресії вільного члена; 2) коефіцієнти регресії чинників, що вивчаються; 3) коефіцієнти регресії між факторних взаємодій; 4) відрядкові дисперсії; 5)

значення критерію Кохрена; 6) адекватність результатів. Докладний і ґрунтовний виклад принципів постановки, проведення і обробки результатів багатофакторних експериментів можна знайти в керівництві по математичному плануванню, викладеному в книзі П.Н. Максимова «Багатофакторний експеримент в біології».

Так, наприклад, при оптимізації початкових умов культивування гіпокотилів шести генотипів томатів був поставлений досвід першого порядку по матриці повного факторного експерименту 24//16, де 2 — число рівнів, на яких випробовувалися чинники; 4 — число чинників, що вивчаються в експерименті (X₁ — інозит, X₂ — сахароза, X₃ — зеатин, X₄—іук); 16 — число дослідів по схемі експерименту. У поєднанні з цитокініном можна використовувати і інші регулятори зростання. Наприклад, у деяких видів наголошується підвищена реакція, коли з БАП застосовують N-діметілами-ноянтарну кислоту в невеликій концентрації. Обробляють *in vivo* все дерево, що росте, або його окремі гілки. Зрізані гілки занурюють в розчин цитокініна або його вводять безпосередньо в судинну систему дерева, наприклад, через кінець зрізаної вітки шляхом ін'єкції. Обробку проводять через 4—5 днів, оскільки частіші обробки гормонами можуть викликати отруєння рослин. Такі обробки індукують утворення нирок або втеч, які набувають морфології, схожої з морфологією молодих особин. Втечі або короткі відрізки стебла, що містять нирки, потім поміщають на живильне середовище (*in vitro*) для індукції зростання нирок і втеч. Втечі, що згодом сформувалися, переносять або на середовище для розмноження, або на середовище для вкорінення. Проміжною стадією при цьому є середовище, сприяє розкриттю нирок, що знов утворилися, і розвитку їх у втечі.

До фізіологічних чинників також відноситься і час (сезонність) ізоляції експлантату. Тканини і органи, ізольовані у момент вегетації рослин, володіють вищою чутливістю до складу живильного середовища і здатні з високою частотою утворювати адвентивні нирки, формувати втечі і укорінятися, чим тканини, ізольовані в період глибокого і вимушеного спокою. Наприклад, весняна посадка апексів агрусу сорту Фінік на живильне середовище Мурасіґа і Ськуґа, БАП, що містить, 0,5 міліграм/л, сприяла проліферації каллусу, з якого потім індукувалися з

високою частотою втечі. Тоді як літня ізоляція апексів стимулювала інтенсивнішу проліферацію каллусу, але при цьому зменшувався відсоток регенерації втеч.

Розмір експланта є ще одним чинником, що визначає успіх мікро розмноження. Чим менше експлант, тим меншою регенераційною здатністю він володіє, і навпаки. Експланти більшого розміру, ті, що складаються з паренхіми, провідної тканини і камбію, можуть незалежно від співвідношення фітогормонів в живильному середовищі спонтанно утворювати нирки. З іншого боку, в крупному експланті збільшується можливість появи в його клітках вірусів і інших патогенів, що перешкоджає оздоровленню розмнжених в культурі тканин рослин. Оптимальна величина експланта залежить від видових особливостей рослини-донора і властивостей органу, службовця джерелом первинного експланта. Так, для малини був встановлений розмір первинного експланта 2 мм, при яких 60% апікальних верхівок рослини регенерували на середовищі Мореля. Для хмелю цей показник коливається від 0,1 до 0,2 мм, а для лука і часнику оптимальний розмір меристеми складає 0,5—0,8 мм.

Гормональні чинники. Важливий чинник, що впливає на успіх клонального мікро розмноження, - гормональний баланс живильного середовища. При високому співвідношенні гормонів (цитокінін — ауксин) відбувається розвиток пазух меристем або утворення адвентивних нирок, при низькому — індукується коріньютворення, а при середньому — спостерігається і проліферація каллусу. Найчастіше при клональному мікро розмноженні використовують ІУК, рідше НУК як ауксинових компоненти, кінетин і БАП представляють при цьому цитокініни. Окрім перерахованих два цитокініни використовуються та інші, у яких активність в стимуляції утворення втеч вища. Цитокініни, використовувані в мікро розмноженні рослин, по своїй активності можна розташувати в наступному порядку: кінетин < 6-бензиламінопурин (БАП) < 2-изопентениладенин (2ір) < зеатин.

Окрім цитокінінів і ауксинів в живильне середовище іноді додають гіббереллову кислоту, яка стимулює зростання і витягування (елонгацію) нирок, що сформувалися, і сприяє отриманню рослин з добре розвиненою надземною частиною.

Принципово можлива індукція і стимуляція різних морфогенетичних реакцій в культурі тканин за допомогою низьких концентрацій екзогенних фітогормонів, і пригніблення загальної активності аж до загибелі рослинних тканин при високій гормональній насиченості живильного середовища. Цю специфіку реакцій культивованих тканин і органів рослин на введення фітогормонів слід враховувати при використанні регуляторів зростання з метою розмноження рослин.

На клональне мікро розмноження, разом з гормонами, впливають мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи. При мікро розмноженні рослин *in vitro* часто використовують середовища Мурасіґа і Ськуґа, Лінсмаєра і Ськуґа, Гресхофа і Доу, Ніча, Хеллера, Шенка і Хильдебрандта і ін., що відрізняються один від одного співвідношенням амонійного і нітратного азоту. В більшості випадків дослідники віддають перевагу середовищу Мурасіґа і Ськуґа, що відрізняється високим вмістом неорганічного азоту. Використання середовищ, збагачених азотом, не тільки веде до неорганізованого зростання калусної тканини, але і стимулює процеси органогенезу і особливо соматичного ембріогенезу. Наприклад, NH_4NO_3 впливає на морфогенетичний потенціал зародків різних видів Brassica. Відсоток виживання зародків і частота утворення втеч збільшуються при зменшенні концентрації NH_4NO_3 в середовищі, а максимальне число втеч на зародках формуються у разі повного виключення NH_4NO_3 з середовища. Зниження змісту KNO_3 і NH_4NO_3 до 6,7 мМ покращувало морфогенез агрусу сортів Інвікта і Карлз. Для томатів експериментально було встановлено, що середовища з підвищеним вмістом мінерального азоту інгібують проліферацію калусу і приводять до загибелі експлантів. Для глоксинії була відмічена залежність утворення вегетативних або репродуктивних структур від концентрації компонентів живильного середовища. Так, при високій концентрації KNO_3 (20 мМ) і сахарози (100 мМ) переважно розвиваються вегетативні нирки, а квіткові тільки у 28% експлантів. При низькому вмісті KNO_3 (2 мМ) і сахарози (15 мМ) на всіх експлантах утворюються тільки квіткові нирки.

Значний вплив на процес мікро розмноження роблять біологічно активні речовини негормональної природи, а також вуглецеве живлення. Як правило, присутність у складі живильного середовища вітамінів, амінокислот, рослинних екстрактів, гідролізату казеїну необхідно для індукції проліферації каллусу і регенерації з нього втеч або ембріодів. Коли ж розвиток втеч відбувається за рахунок існуючих пазух меристем або нирок, що сформувалися, і ембріодів, то звичайний вплив біологічно активних добавок стає неістотним, бо втечі самі здібні до синтезу потрібних для їх життєдіяльності речовин. Було відмічено, що високі концентрації біологічно активних речовин приводять до гіпервітамінозу, що виявляється в пригнібленні зростання, побурінні і висиханні листя, в зміні морфології рослин.

На всіх етапах клонального мікро розмноження як джерело вуглецевого живлення використовують 3%-ну сахарозу. Проте ця концентрація не є оптимальною для всіх, що вводяться в культуру *in vitro* рослин. Так, наприклад, експериментально було доведено, що сахароза є чинником, здатним направити розвиток втеч каперса *in vitro*, і що можна отримувати або вегетуючі втечі, або пурпурні нирки відновлення. При культивуванні апікальних і бічних нирок на середовищі, що містить сахарозу в концентрації 3% і більш, спостерігається поява антоціанового забарвлення нирок, що є першою ознакою переходу нирок в стан зимового спокою. При використанні ж знижених концентрацій (менше 3%) відбувається формування зелених нирок, здібних надалі до розмноження (С.А. Сафразбекян, В.В. Урманцева, Н.

У роботах з ізольованими зародками їли звичайною була також виявлена негативна роль високої концентрації сахарози (2—3%) на процес утворення адвентивних нирок. Було показано, що вже на другому пасажі цей процес практично не відбувається, а до четвертого пасажу спостерігається загибель всіх експлантів. Понижений вміст сахарози в середовищі стимулював не тільки утворення адвентивних нирок, але і подальший їх розвиток у втечі. При 0,5—1%-вої концентрації сахарози втечі через 2—3 місяці культивування мали висоту 1 —1,5 см і потім використовувалися для подальшого розмноження або вкорінення.

Крім сахарози як джерело вуглецевого живлення можливо використовувати глюкозу, фруктозу, галактозу і ін. Відомо, що після сахарози, що найбільш вживається, вуглецеве живлення для культивування *in vitro* тканин рослин є глюкоза. З 38 досліджених культур (трав'янистих і деревинних) 85% мали відмінне і хороше зростання на середовищі з глюкозою.

На третьому місці по ефективності використання культурами тканин рослин коштує фруктоза. На думку Міноха, 1 з 2 культур успішно використовували для свого зростання фруктозу. Галактоза — помітно відрізняється від глюкози і фруктози по дії на зростання ізольованих тканин рослин. Більше половини вивчених культур слабка або майже не використовують галактозу для зростання. Проте є дані, що відзначають позитивну роль галактози для культивування тканин і органів рослин.

Таким чином, проблема використання гормонів, біологічно активних речовин і мінеральних солей не повинна зводитися до простого включення цих з'єднань до складу живильного середовища по готових стандартних рецептах, а повинна вирішуватися з урахуванням конкретних морфогенетичних реакцій, використовуваних для мікро розмноження того або іншого виду рослин.

Фізичні чинники. Консистенція середовища є важливим чинником, що впливає на процеси зростання експлантів і утворення адвентивних нирок. Відомо, що при культивуванні експлантів верхівки втеч в рідких живильних середовищах на апаратах ролерного типу значно стимулюється їх зростання, не спостерігається яскраво вираженого апікального домінування втеч, скорочується період вирощування і кількість пересадок, що обумовлюється хорошим постачанням рослин живильними речовинами. З іншого боку, в цих умовах зростає можливість освіти аномальних, втеч. Використання твердих агаризованих середовищ сприяє подоланню витрифікації, але, разом з тим, цей спосіб вирощування погіршує умови живлення експлантів і перешкоджає видаленню продуктів метаболізму.

На клональне мікро розмноження і зростання рослин також впливає і кислотність середовища, що визначає доступність для рослин живильних речовин. Відомо, що сильно кислі або лужні середовища лімітують надходження деяких елементів, наприклад, фосфору і заліза, роблячи їх відносно нерозчинними і цим обмежуючи зростання рослин. В той же час при високій кислотності велика кількість цих елементів переходить в розчинений стан і стає токсичним для експлантів.

Як правило, тканини і органи рослин культивують на живильному середовищі з рН 5,6—5,8. Проте ці умови не завжди можуть бути оптимальними. Наприклад, для культури зародків сосни звичайною було показано, що зміна кислотності живильного середовища від 4,7 до 5,2 дозволяє збільшити в 2,5—3 рази здатність зародків утворювати адвентивні нирки, а для культури їли звичайною найбільш сприятливий рН середовища знаходився в межах 5,2—5,6. Ці дані повністю співпадають з кислотністю ґрунти, на яких успішно виростають дані породи в природних умовах. Тому біотехнології повинні враховувати в експериментах по культурі тканини кислотність ґрунтів природного зростання досліджуваних рослин.

Зазвичай ізольовані тканини рослин вирощують при освітленні люмінесцентними лампами з урахуванням вимог материнської рослини до інтенсивності і фотоперіоду. Мурасіге рекомендує на першому і другому етапах клонального мікро розмноження рослин культивувати тканини при 1—5 тис. лк і 14—16-годинному фотоперіоді, такі умови освітлення сприяють ініціації втеч і коріння у більшості рослин.

Багато досліджень свідчать, що інтенсивність освітлення грає важливу роль в індукції органогенезу. Збільшення освітленості з 3 до 6 тис. люкс сприяло інтенсивному паросткоутворенню в культурі бегонії. Максимальне утворення втеч і коріння в культурі тканин аспарагуса відмічене при 1 тис. лк (16-годинний фотоперіод), зниження або збільшення інтенсивності освітлення пригноблювало органогенез тканин.

Інтенсивність і характер зростання ізолюваних тканин залежать і від спектрального складу світла. Червоне світло стимулює утворення квіткових нирок у тканини тютюну, а темнота — утворювання коріння. Адвентивні нирки в каллусі тютюну індикуються ультрафіолетовим, блакитним і фіолетовим світлом. У експлантів салату червоне світло викликає утворення втеч. Для пробірних рослин картоплі було встановлено, що присутність в середовищі НУК або ІУК значно сильніше стимулювали клубнеутворення на червоному, чим на синьому світлі, тоді як БАП або кинетин стимулювали клубневий ріст активніше на синьому в порівнянні з червоним світлом (Т.Н. Константінова і ін., 1988). Найбільш сприятлива дія на вкорінення втеч берези, активацію існуючих меристем надає червоне світло, при якому практично 100% мікро живців утворює коріння. При білому світі цей процес йде менш активно, а при синьому — коріння утворюється тільки у половини живців, і в темноті — у ще меншого числа. Поєднання червоного світла з введенням в середу ІУК. значно прискорює процес корне утворення і підвищує інтенсивність зростання втеч. Синє світло збільшує вміст цитокинінів в тканинах рослин і тим самим стимулює утворення втеч.

Температура робить значний вплив на зростання і регенерацію ізолюваних тканин рослин, сприяючи активації метаболічних процесів. Для більшості рослинних тканин температурний оптимум складає 23—25° С. Адаже існують відмінності між рослинами відносно їх вимог до температури. Так, утворення цибулин найефективніше при 20° С охолоджені експлантів, передування культивуванні тканини гладіолуса, покращує її регенераційну здатність. Низькі температури (15—18° С) протягом 2 тижнів необхідні для індукції утворення втеч в культурі черешків бегонії. Для нирок квітконосців фаленопсиса наголошується вплив температури на тип морфогенезу: при + 28° Із з нирок регенерують вегетативні втечі, а при + 20° С — генеративні.

Температурний режим залежить, головним чином, від виду рослин. Так, наприклад, для тропічних рослин оптимальна температура вирощування наближається до 27° С, для рослин

альпійських луків—18—20° З, для більшості інших—25° С. При клональному мікро розмноженні пробірні рослини вирощують в кліматичних камерах, де підтримується 16-годинний фотоперіод і 70%-ная відносна вологість повітря.

Таким чином, для підвищення коефіцієнта розмноження рослин необхідно кожному виду з урахуванням його природного ареалу зростання підбирати індивідуальні умови культивування.

Отже, клональне мікро розмноження є новим перспективним способом вегетативного розмноження рослин, що дозволяє отримувати генетично однорідний, оздоровлений посадочний матеріал, мати високий коефіцієнт розмноження, скорочувати селекційний процес, проводити роботи протягом круглого року, економлячи при цьому площі, необхідні для вирощування рослин. У багатьох країнах світу біоіндустрія мікроклонального розмноження поставлена на поточкову промислову основу і представлена десятками активно функціонуючих підприємств.

Контрольні запитання:

1. Яким чином проводять мікроклональне розмноження рослин?
2. Від яких чинників залежить мікроклональне розмноження?
3. Які фітогормони краще використовувати для розмноження рослин?
4. Які фізичні чинники впливають на успіх мікроклонального розмноження?

Тема 4. Генетична інженерія рослин

4.1. Традиційні методи селекції

Традиційні методи селекції і методика злиття протопластів дозволяють отримувати нові генотипи рослин, і в цьому сенсі вказані методи можна віднести до генно-інженерних. Проте нові генетичні комбінації, що виникають випадковим чином, вимагають багато праці, час і терпіння, щоб отримати бажану зміну фенотипу, як результат реорганізації генетичного матеріалу. Крім того, схрещування відбувається між обмеженим числом генотипів, і загальний генофонд виявляється обмеженим. У цьому генофонді може взагалі не міститися гени, які могли б поліпшити сорт.

Технологія рекомбінантних ДНК в принципі дозволяє виділяти в чистому вигляді і в достатній кількості будь-який ген і за наявності відповідного вектора або іншим способом вбудовувати цей ген (або гени) до складу хромосомної ДНК і добитися його експресії. Ми розглядатимемо генетичну інженерію в плані використання технології рекомбінантних ДНК для створення нових генотипів, а значить, і форм рослин. Застосування цієї технології робить пошук цілеспрямованим і значно розширює можливості маніпулювання генетичним апаратом при скороченні часу отримання нових форм рослин.

Важливою перевагою рослин в порівнянні з тваринами є та обставина, що клітки рослин в культурі володіють властивістю тотипотентності, тобто за наявності 7-177 відповідних умов принаймні частина кліток може розвинути в цілу рослину. Такою ж властивістю володіють і рослинні протопласти — клітки, позбавлені целюлозної оболонки. Які ж гени потрібно клонувати і вводити в рослини, щоб їх поліпшити? Найбільш доцільне придбання наступних ознак: стійкість до холоду, засухи, підвищеного засоленості ґрунту, тобто до стресових дій

зовнішнього середовища, також корисна стійкість до шкідників, гербіцидів і пестицидів, резистентність до хвороб, скороспілість і ін. Визначення і виділення генів, відповідальних за ці ознаки, - завдання надзвичайно важке. Справа ускладнюється ще і тим, що геном рослин вивчений гірше, ніж геном ссавців.

Інша проблема пов'язана з введенням і адекватною експресією генів. Тут основне завдання пов'язане із створенням векторних молекул і з розробкою методу прямого перенесення генів. Сюди ж входить завдання відбору трансформованих кліток і забезпечення стабільного спадкоємства придбаної ознаки. Вирішення цих завдань істотно полегшується у зв'язку з виявленням природного генного вектора, що виник в результаті еволюції ґрунтових бактерій.

Нарешті, третя проблема стосується регенерації трансформованих кліток або протопластів в цілу фертильну рослину. Річ у тому, що регенерацію вдалося отримати для дводольних рослин. Тільки для деяких господарської корисних рослин вдалося налагодити методичний цикл від протопласта до рослини. Це картопля, люцерна, томати, морква, тютюн, капуста і ін. Що ж до злаків, то регенерацію їх кліток поки надійно здійснити не вдалося._

Ми перерахували основні проблеми, які «лежать на поверхні», і важко передбачити, яка безліч перешкод встане на шляху дослідників.

Вектори на основі T1-плазмід. Деякі види бактерій з групи агробактерій можуть заражати рослини і викликати при цьому утворення пухлин — корончатих галлів. Пухлини складаються з недиференційованих кліток, що інтенсивно діляться і ростуть в місці зараження. Майже всі дводольні рослини чутливі до бактерій, а злаки і інші однодольні — ні. При культивуванні клітки пухлини можуть рости у відсутність гормонів, необхідних для зростання нормальних рослинних кліток. Якщо убити всі бактерії антибіотиком, то клітки корончатих галлів зберігають трансформований фенотип. На прикладі одного з найсильніших індукторів пухлин було показано, що власне пухлиннорідним агентом є плазміда, частина якої зустрічається в хромосомах кліток рослини (рис. 4.1).

Після трансформації клітки рослини починають синтезувати незвичайні амінокислоти — опини, які використовуються бактеріями як джерело азоту і вуглецю. Таким чином утворення пухлини супроводжується перебудовою метаболізму кліток, і вони починають синтезувати з'єднання, необхідні тільки для бактерій.

Плазмід, що викликають пухлини, називаються Ті-плазмідами (від англ. tumor inducing — що ініціюють пухлину). Це кільцеві молекули завдовжки близько 200 кб (3—5% від розміру хромосоми агробактерії).

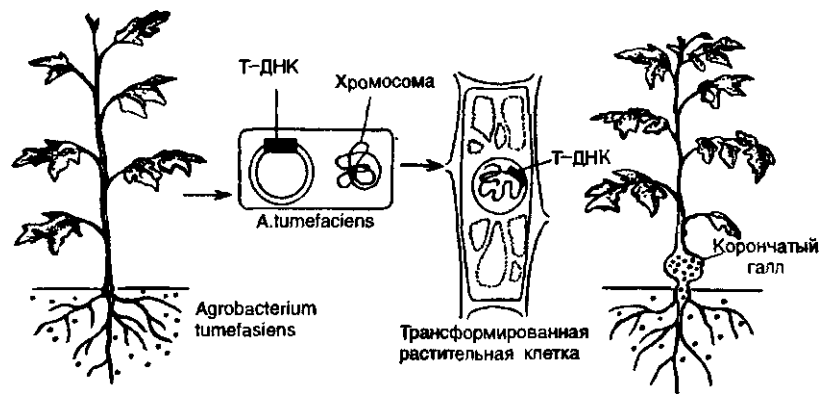


Рис. 4.1. - Т-ДНК, інтегруючи в хромосому рослини, індукують утворення пухлини (корончатого галла)

У бактерійних клітках вони реплікуюються автономно. Ті-плазміді розрізняють за типом опіна, що синтезується. Найчастіше зустрічаються плазміді, кодуєчі нопалін або октопін, причому клітка може містити тільки один тип плазміді: або октопінову, або нопалінову.

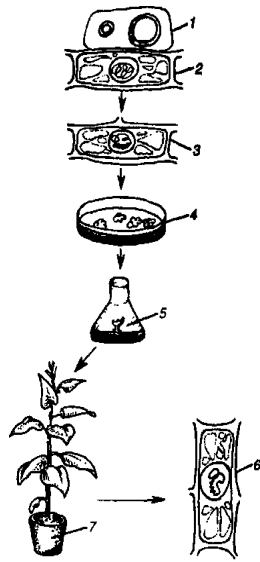
Генетичні дослідження показали, що гени, відповідальні за індукцію пухлини, синтез опінів і придушення диференційовки, розташовані близько один від одного і входять до складу Ті-області плазміді, яка вбудовується в хромосому клітки при інфекції. Т-сегмент має довжину близько 20 кб (10% Ті-плазміді) і вбудовуються в різних, мабуть неспецифічних, областях хромосоми. На Т-області картировано сім генів, кожен з яких регулюється власним промотором. Ці гени відповідають за синтез опіна і за придушення диференційовки кліток (придушення утворення коріння і втеч). Важливо відзначити, що всі гени, відповідальні за перенесення інтеграцію Т-ДНК, знаходяться не в Т-ДНК, а в області вірулентності (vir-область).

Унікальні біологічні властивості Ті-плазміді роблять його ідеальним вектором, природним агентом для перенесення генів. Вона має широкий круг господарів, вбудовує ДНК до складу хромосоми, де вона реплікується і велика її частина транскрибується з утворенням білка. Істотно також, що межі Т-ДНК позначені прямими послідовностями, що повторюються, довжиною 25 нуклеотидних пар, і будь-яка ДНК, вставлена між цими повторами, буде прийнята за Т-ДНК і перенесена в рослинну клітку. Оскільки гени у складі К-ДНК мають промотори, то під їх контроль можна поставити чужорідні гени. Проте із-за великих розмірів маніпуляції з Ті-плазміді утруднені, вставити ген в плазміді традиційними методами не представляється можливим.

4.2 Проміжний і бінарний вектори

Один із способів введення чужорідної ДНК полягає у використанні проміжного вектора. Сенса підходу полягає в наступному (мал. 3.19). Спочатку Т-ДНК за допомогою рестриктаз вирізує з плазміді і вставляє у вектор для клонування в *E. coli* (наприклад, pBR 322). Плазміді з Т-ДНК розмножують і, використовуючи стандартні методи, вбудовують чужорідний ген всередину Т-області і знов розмножують з вже вставленим геном. Потім отриману рекомбінантну плазміді вводять в клітки *A. tumefaciens*, що несуть повну Ті-плазміді. В результаті подвійного кросинговера (гомологічній рекомбінації) між гомологічними районами Т-ДНК частина рекомбінантної плазміді, яка містить чужорідний ген, включиться в Ті-плазміді, замістивши в ній нормальну Т-ДНК. Нарешті, бактеріями, що мають Ті-плазміді з вбудованими генами, заражають рослини і в результаті отримують клітки корончатого галла, які міститимуть Т-область з вбудованим в неї чужорідним геном.

Інший найвідоміший метод введення чужорідної генетичної інформації полягає у використанні бінарних векторів. Виявилось, що для зараження і трансформації рослинних



кліток агробактеріями необхідна у Іг-області, відповідальна за перенесення ДНК і прямі повтори, що обмежують Т-район. Більш того, у Іг-область і ДНК, що містить на кінцях прикордонні повтори Т-района, можуть знаходитися в різних плазмідах. Бактерії, що містять П-плазмиду з уІг-областю і іншу плазмиду, в якій в

ДНК вбудовані будь-які гени, забезпечують інтеграцію останньою в геном рослини. Гомологічна рекомбінація для цього не потрібна.

Проте отримані клітки не будуть здібні до регенерації, оскільки в них пригнічено диференціювання. Якщо ж в гени, блокуючі диференціювання, ввести мутації або вирізувати їх з Т-ДНК, трансформовані клітки знайдуть здатність до регенерації. Так, ген алкогольдігідрогенази (АДГ) дріжджів був вбудований в область клонованої Т-ДНК, відповідальну за придушення диференціювання. Цією Т-ДНК трансформували клітки тютюну, з яких потім

вдалося регенерувати цілі рослини, що містять в геномі численні копії АДГ, — Т-ДНК-Рослини були фертильними і в клітках потомства також містилися копії химерної ДНК. У загальному випадку для конструювання нешкідливого (для регенерації) вектора з Т-ДНК потрібно видалити всі її власні гени, залишивши сигнальні прямі повтори і чужорідну

ДНК- Для того, щоб ця ДНК експресювалась в рослинних клітках, конструюють складений ген, в якому регуляторна область з промотором узята від одного з генів Т-області (наприклад, гена нопалінсинтетази, відповідального за синтез нопаліна), а структурна частина представлена структурною частиною гена, який потрібно ввести в рослину. Показано, що такі складені гени, будучи інтегрованими в геном рослини, добре експресуються під контролем нового промотора.

Рис. 4.2. Етапи трансформації і отримання трансгенних рослин

Таким чином, проблема експресії генів в трансформованих рослинах в принципі вирішена.

Ще одне сімейство плазмід *A. rhizogenes* викликає посилене утворення корінців при зараженні рослин. Ці плазміди названі Ri-плазмідами (від англ. root inducing—індукуючий) рис.4.3. Містять опини, а їх геноми містять по декілька копій Т-ДНК- Ri-плазмиди вигідно відрізняються від Ti-плазмід тим, що вони є природними нешкідливими векторами, тобто після трансформації рослинні клітки здатні регенерувати в здорові плодовиті рослини. В даний час ці плазміди розглядаються як перспективніші вектори.

4.3. Вектори на основі ДНК вірусів

Переважну більшість фітовірусів як носія генетичної інформації містять РНК- Лише 1—2% від числа вірусів, що інфікують рослини, відносяться до ДНК-змістовним. Саме вони найбільш зручні для використання в технології рекомбінантних ДНК і розглядаються головними кандидатами на роль векторів для перенесення генів в рослини. Найбільш перспективним в цьому відношенні і тому краще вивченим є вірус мозаїки цвітної капусти СМВ (cauliflower mosaic virus), що вражає в основному рослини сімейства хрестоцвітих. Частинок цього вірусу мають діаметр близько 50 нм

і містять кільцеву ДНК завдовжки 8 кб. З віріонної ДНК транскрибуються не менше 80% інформації, і, принаймні, деякі з тих, що утворилися РНК є матрицями для синтезу білків.

Невеликий розмір генома SAMV дає можливість маніпулювати *in vitro* з вірусною ДНК, як з бактерійною плазмідною, і потім вводити її в рослини шляхом втирання в листя. Інфікування невеликого числа кліток приводить до зараження всієї рослини, оскільки вірус швидко розповсюджується, передаючись від клітки до клітки. При використанні 1—5 мкг клонованої ДНК для інфікування однієї рослини за допомогою механічної інокуляції досягається майже 100%-ная ефективність інфекції.

Для клонування ДНК SAMV в *E. coli* використовують плазмідні вектори *E. coli*, наприклад, pBR 322. Після обробки відповідними рестриктазами ДНК SAMV і pBR 322 і лігирування утворюється гібридна плазміда, здібна до ампліфікації в *E. coli*.

Пряма інтеграція ДНК SAMV в геном господаря після інфекції не показана. Розроблений методичний прийом — агроінфекція, що дозволяє здійснити пряме вбудовування вірусної ДНК після інокуляції. Для цього геном SAMV вбудовується в Т-ДНК і в її складі інтегрує в ядерний геном різних рослин.

До переваг векторних систем на основі вірусів можна віднести наступні: малий розмір генома, що дає можливість легко маніпулювати вірусній ДНК; висока копійність вірусної ДНК в клітках заражених рослин (до 50 ТОВ на клітку); наявність сильних промоторів, які можуть забезпечити ефективну експресію чужорідних генів.

Серед недоліків слід зазначити невелику ємкість вектора (менше 800 н. п.) і обмежений круг господарів — хрестоцвітні. Ємкість вектора можна збільшити до 800—1000 н. п., якщо інфікувати вірусом рослинні протопласти. В цьому випадку інфекція не передається від клітки до клітки і немає необхідності в упаковці ДНК в частинки. Таким чином, частина вірусного генома, відповідальна за упаковку у вірусні частинки, може бути видалена і замінена чужорідною ДНК.

На закінчення слід зазначити, що сильні вірусні промотори можуть використовуватися для експресії чужорідних генів в інших векторних системах. Наприклад, промотор ЗББ РНК вірусу мозаїки цвітної капусти є сильним промотором, крім того, він не проявляє тканіспецифічності експресії і активний не тільки в клітках хрестоцвітних, але і в клітках інших сімейств.

4.4. Використання хлоропластної і мітохондріальної ДНК рослин для створення човникових векторів

Геном хлоропласту складається з кільцевих молекул ДНК завдовжки 120—140 кб. У середині хлоропластів одного вигляду міститься до декількох десятків таких кільцевих молекул, близьких по нуклеотидній послідовності. Клітка містить до декількох десятків хлоропластів, і, таким чином, загальне число кільцевих молекул складає декілька сотів копій на клітку. До складу кільцевих молекул входять гени рибосомальних і транспортних РНК, а також гени, продукти яких необхідні для функціонування хлоропластів.

Реплікація і транскрипція хлоропластного генома здійснюється автономно. Останню обставину дає можливість використовувати хлоропластну ДНК як вектор. Якщо ж «зшити» бактерійну плазмиду з фрагментом ДНК хлоропласту, що містить ділянки почала реплікації і ділянки ініціації і термінації транскрипції, то можна отримати човниковий вектор. Такий вектор здатний реплікуватися в прокаріотичних клітинах, а в клітинах еукаріот не тільки реплікуватися, але і експресювати чужорідну генетичну інформацію. Такі вектори функціонуватимуть як епісоми, тобто автономно від хромосоми. Для конструювання човникових векторів рослин можуть бути також використані кільцеві молекули мітохондріальної ДНК, довжина яких варіює в широких межах — від 1 до 50 кб.

Кільцеві молекули ДНК також виявлені в ядрі і цитоплазмі рослинних кліток. Походження їх ще не ясно. Це можуть бути ампліфіковані гени або транспозоноподібні елементи. Ці кільцеві молекули інтенсивно вивчаються і, мабуть, можуть бути використані для створення векторів.

4.5. Методи прямого перенесення генів в рослину. Трансформація рослинних протопластів

При обробці целюлозної клітинної стінки рослини ферментом целюлозною, виділеною з грибів, утворюється клітка, позбавлена оболонки, або протопласт. Розроблені методи прямої трансформації протопластів за допомогою ДНК. Найбільшій ефективності трансформації (10 %) вдалося досягти комбінацією методики кальцієвої преципітації ДНК з методикою злиття протопластів. Хоча частота трансформації значно нижча, ніж, наприклад, частота перенесення ДНК при сумісному культивуванні з *A. luteo*, метод прямого перенесення володіє поряд переваг.

Донорна ДНК може не містити спеціальних біологічних сигналів і функцій трансформації. Для трансформації може бути використаний практично будь-який ДНК-вектор, що несе чужорідний ген. При цьому гібридний ген стабільно інтегрує в ядерну ДНК рослини і експресується (за наявності відповідних регуляторних областей).

Метод кокультивації. Цей метод може розглядатися як індукція пухлин в штучних умовах. Спочатку отримують культуру протопластів, потім на початковій стадії її зростання, коли протопласти тільки що регенерували клітинну стінку і почали ділитися, культуру заражають агробактеріями. Період кокультивації, протягом якого протопласти агрегують з бактеріями, складає 32 ч.

Модифікація методу кокультивації протопластів з дозволила підвищити його ефективність і скоротити час отримання трансформантів до трьох тижнів. При цьому як селективна ознака використовували ту обставину, що тільки трансформовані клітки здатні рости без добавок фітогормонів.

Мікроін'єкції ДНК. У ряді експериментів було показано, що метод мікроін'єкцій може успішно застосовуватися для трансформації рослинних кліток аналогічно мікроін'єкціям тваринних кліток (див. с. 189). Це стало можливим після подолання ряду технічних труднощів, зокрема, розробки методу отримання протопластів для ін'єкцій шляхом прикріплення їх до стекол полілізіном.

Для мікроін'єкцій застосовується мікроголка із зовнішнім діаметром 2 мкм і внутрішнім 1 — 1,25 мкм. Об'єм ін'єкцій в кожен протопласт складає (1 — 10) — Ю 4 мл, при концентрації ДНК — 0,1 — 1,0 мкг/мкл.

Трансформація рослинних кліток відбувається з ефективністю 10—20%, незалежно від типу вектора. У цьому сенсі метод можна розглядати як найбільш універсальний. Важливо також, що трансформація немає видоспецифічній, і її можна застосовувати, коли інші способи перенесення генів неможливі (наприклад, агробактерії мають обмежений круг господарів). Багато дослідників вважають, що мікроін'єкції придатні для всіх типів рослин.

Електропорація. Цей метод заснований на тому, що імпульси високої напруги оборотно збільшують проникність біомембран. Для рослинних протопластів процедура електропорації виявилася дуже ефективною. Метод полягає в наступному: на рослинні протопласти у високих концентраціях, що знаходяться в середовищі електропорації, що містить ДНК, діють високовольтним імпульсом. В результаті молекули ДНК поглинаються клітками через пори в клітинній мембрані. Далі після розведення протопласти висівають на відповідне середовище для пророщування. Ефективність перенесення визначається через 24—48 ч після електрошоку (напруга 200—350 В, тривалість імпульсу 54 мс).

При перенесенні електропорації вдалося отримати експресію чужорідних генів. Вона показана на двох типах промоторів— NOS (нопалінсинтезного) промотора Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, під контролем якого експресювалась хло- рамфеніколацетілтрансфераза (CAT), і 35S-промотора вірусу SAMV.

Упаковка в ліпосоми. Це один з методів, використовуваних для захисту екзогенного генетичного матеріалу, який вводиться в протопласти рослин, від руйнуючої дії нуклеаз.

Екзогенний генетичний матеріал, що вводиться в протопласти рослин, потребує надійного захисту від дії ферментів— нуклеази, які руйнують нуклеїнові кислоти. Один з методичних підходів полягає у використанні ліпосом. Ліпосоми — це сферичні утворення, оболонки яких складаються з фосфоліпідів. Їх можна отримати в результаті різкого струшування або обробки

ультразвуком водних емульсій фосфоліпідів. Ліпосоми, що складаються з фосфатидилсерина і холестерину, найбільш придатні для введення ДНК в клітки тварин і рослин.

За допомогою ліпосом в протопласти рослин були введені РНК вірусу тютюнової мозаїки, ДНК Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, а також цілі метафазні хромосоми. Особливо важливо для системи перенесення в протопласти рослин те, що ліпосоми надійно захищають молекули нуклеїнових кислот від дії нуклези, присутніх в значних кількостях поза клітками. До переваг систем перенесення за допомогою ліпосом можна віднести їх низьку токсичність по відношенню до кліток і можливість їх використання на безлічі рослин, клітки яких здатні утилізувати ліпосоми.

На закінчення слід підкреслити, що подальше вдосконалення методів прямого перенесення генів в істотній 202 ступені залежить від зростання ефективності трансформації кліток. До теперішнього часу ефективність прямого перенесення генів в протопласти підвищилася в 100 разів в порівнянні з часом перших повідомлень. Без селекції 2% всіх колоній піддаються трансформації.

Метод біологічної балістики. Метод біологічної балістики (біолисти) є одним з найефективніших на сьогоднішній день методів трансформації однодольних. Як початковий матеріал для трансформації береться суспензійна культура, каллусна тканина або 4—5-днівні культивовані незрілі зародки однодольних.

Суть методу полягає в тому, що на найдрібніші частинки вольфраму, діаметром 0,6—1,2 мкм, напилються ДНК вектора, що містить необхідну для трансформації генну конструкцію. Вольфрамові частинки, що несуть ДНК, наносяться на целофанову підкладку і поміщаються всередину біолистичної гармати. Каллус або суспензія кліток наноситься в чашку Петрі з агаризованим середовищем і поміщається під біолистичну гармату на відстані 10—15 див. У гарматі вакуумним насосом зменшується тиск до 0,1 атм. У момент скидання тиску вольфрамові частинки з величезною швидкістю викидаються з біолистичної гармати і, розриваючи клітинні стінки, входять в цитоплазму і ядро кліток. Зазвичай клітки, розташовані безпосередньо по центру, гинуть через величезну кількість і тиск вольфрамових частинок, тоді як в зоні 0,6—1 см від центру знаходяться найбільш вдало протрансформовані клітки. Далі клітки обережно переносять на середовище для подальшого культивування і регенерації.

За допомогою біолистичної гармати були протрансформовані однодольні рослини, такі, як кукурудза, рис, пшениця, ячмінь. При цьому були отримані стабільні рослини-трансформанти.

Окрім успіхів в отриманні трансгенних однодольних, біолистична трансформація застосовується для прямого перенесення ДНК в ембріогенний пилочок і подальшого швидкого отримання трансгенних дігаплоїдних рослин, які є важливим етапом в селекційній роботі. В даний час цим методом була проведена трансформація рослин тютюну і після регенерації гаплоїдних рослин отримані стабільні трансформанти.

4.6. Поліпшення якості зерна методами генної інженерії

Одним з основних завдань поліпшення рослин є підвищення якості продуктів, що синтезуються: білків, жирів, полісахаридів і інших речовин, що визначають живильну і технічну цінність.

У злаків найбільший інтерес представляють білки, що запасуються в ендоспермі. Запасні білки, в основному, кодуються декількома схожими по своїй структурі і по нуклеотидному складу генами, об'єднувані в мультигенні сімейства. Зазвичай експресія цих генів строго тканеспецифічна і відбувається на певній стадії розвитку сім'я. В більшості випадків запасні білки мають незбалансований для живлення людини і тварин амінокислотний склад. Так, запасні білки бобів — леуміни — характеризуються низьким рівнем амінокислоти метіоніну, а запасні білки злаків — проламіни — бідні лізином, триптофаном і треоніном. Дефіцит цих амінокислот знижує живильну і кормову цінність насіння.

Поліпшення амінокислотного складу білка методами традиційної селекції досить скрутно у зв'язку з тим, що гени, що визначають важливі сільськогосподарські ознаки, часто бувають зчеплені і, отже, успадковуються разом з небажаними ознаками. Так використання в селекції

кукурудзи і ячменю мутантів типу opak-2, хайпроли, що мають відносний високий вміст лізину в зерні, не привело до значного поліпшення якості, оскільки у форм мутантів підвищений вміст лізину корелював із зменшенням синтезу основних запасних білків зеїну і гордеїну і, зрештою, із зменшенням врожайності.

У зв'язку з цим найбільш перспективним є використання генно-інженерних методів при створенні нових покращених сортів, що дозволяє ввести в геном тільки сільськогосподарська корисна ознака, без зчеплення з непотрібними ознаками. Так, наприклад, введення додаткових кодонів лізину в індивідуальні гени проламінів привело б до синтезу білків, збагачених лізином, і поліпшило б кормову і живильну цінність білка. Розглянемо етапи генно-інженерних маніпуляцій, що приводять до отримання трансгенних рослин з покращеним амінокислотним складом білка.

Ця робота включає ряд етапів: 1) клонування генів запасних білків; 2) вивчення механізмів тканіноспецифічної і тимчасової експресії білків і визначення послідовності ДНК, що визначає даний механізм; 3) цілеспрямована зміна послідовності генів запасних білків з метою поліпшення амінокислотного складу; 4) створення векторів, що містять змінений ген; 5) введення модифікованих генів в рослини.

Отримання трансгенних рослин з поліпшеними якостями неможливе без величезного підготовчого етапу, що включає детальне вивчення як всього гена, так і його елементів, що беруть участь в регуляції синтезу білка.

На сьогоднішній день охарактеризовані десятки генів запасних білків злаків, бобів і ряду інших рослин, вивчені структура і властивості цих генів.

Загальний план ізолювання генів запасних білків включає наступні етапи. 1) отримання і часткове очищення відповідної мРНК; 2) синтез і клонування кДНК; 3) ізолювання з бібліотек геномів послідовності гена конкретного запасного білка.

В даний час клоновано 10 генів гордеїнів ячменю, гени α - і ρ -гліадинів і глютеніну пшениці, зеїнів кукурудзи, легуміна бобів, пататина картоплі і ряд інших. При цьому слід зазначити, що для деяких з генів визначена навіть нуклеотидна послідовність.

Подальше дослідження генів запасних білків показало спільність будови цих генів, що представляється логічним, оскільки вони виконують однакову функцію. Так, загальною для переважної більшості генів запасних білків є відсутність інтронів. Крім того, у них на відстані 300 н. п. від крапки почала транскрипції розташована специфічна послідовність в 25 н. п., названа ендосперм-боксом.

Синтез запасних білків має жорстку регуляцію: гени експресуються тільки в єдиній тканині (проламіни злаків тільки в ендоспермі зерна) і протягом короткого періоду розвитку зерна. Чим же це досягається? Для вивчення механізму тканіноспецифічної і тимчасової експресії генів використовують так званий деліційний аналіз, який припускає вирізування різних фрагментів гена, з тим щоб визначити значущість того або іншого фрагмента для функціонування цілого гена. Так, методом деліційного аналізу було показано, що саме 25-нуклеотидная послідовність ендосперм-бокса стимулює експресію генів запасних білків в ендоспермі зерна. Більш того, було показано, що продукт будь-якого гена, перед яким знаходиться послідовність ендосперм-бокса, синтезується тільки в насінні або зернах.

Таким чином було визначено значення цієї 25-нуклеотидної послідовності для синтезу запасних білків, а також необхідність включення її до складу трансформаційних векторів, що містять модифіковану послідовність генів проламінових білків з метою їх подальшого депонування в насінні або зернах.

Розглянемо наступний етап в отриманні трансгенних рослин з покращуваними амінокислотним складом білка на прикладі модифікованого α -зеїна кукурудзи. Додаткові кодони в послідовність гена вводили за допомогою оліго- нуклеотидноправленого мутагенезу. Вперше така робота була проведена по введенню кодонів лізину в послідовність гена, і якраз на гені α -зеїна. Тепер таке введення нових триплетів є досить звичайним.

Після модифікації нуклеотидної послідовності гена α -зеїна слідувало з'єднання всіх частин у вектор для трансформації. Це здійснювалося з використанням рестриктаз, що вирізують необхідні фрагменти гена, в нашому випадку модифікованого гена α -зеїна, з клона бібліотеки генома, і

промотора, в даному випадку це промотор р-фазолінового гена. Крім того, до складу конструкції входила послідовність ендосперм-бокса. З'єднання цих фрагментів ДНК і клонування у вектор відбувалося з використанням ДНК-ЛІГАЗИ.

Крім того, до складу вектора повинен входити ген-маркер, по якому вестиметься селекція. У найчастіше використовуваних конструкціях таким маркерним геном є ген Кт", що визначає стійкість до антибіотика канаміцину. Наявність маркерного гена необхідна для того, щоб на ранніх стадіях можна було відібрати тільки ті рослини, в геном яких був інтегрований вектор, оскільки неможливо відрізнити на стадії каллусу або ранніх етапів регенерації трансформовані рослини від нетрансформованих. Якщо трансформацію проводять за допомогою агробактерії, то вибираються векторні системи на основі Т1-плазмиди і гена, що цікавить нас, разом з геном-маркером вбудовується в область Т-ДНК.

Таким чином, в Т-ДНК область вектора входить модифікована послідовність гена а-зеїна з промоторною областю, маркерний ген Кт1, що визначає стійкість до канаміцину, і повтори правої і лівої межі, фланкуючі Т-ДНК. Векторну конструкцію вводять в клітки агробактерії. Трансформація рослинних кліток тютюну відбувається при кокультивуванні фрагментів листа тютюну і агробактерії, внаслідок чого відбувається вбудовування векторної конструкції з модифікованим геном зеїну в окремі клітки мезофіла листа. Потім фрагменти листа тютюну переносяться на середовище для регенерації. Введення до складу середовища для регенерації рослин-трансформантів антибіотика канаміцина приводить до виживання тільки тих рослин, геном яких містить векторну послідовність модифікованого гена запасного білка і генамаркера. Отримані рослини-трансформанти, відібрані на селективному середовищі з антибіотиком, аналізують на присутність векторної конструкції методом блот-гібридизації і визначають рівень експресії модифікованого білка.

Експеримент по трансформації пшениці геном високомолекулярної субодиниці білка глютеніну із зміненою послідовністю показав, що введення в геном рослини модифікованого гена проламіну приводить до активного синтезу модифікованого білка і впливає на склад і рівень відповідних запасних білків, що, зрештою, привело до поліпшення хлібопекарської якості пшеничної муки.

Одним з нових підходів до поліпшення складу білків є конструювання химерних генів на основі генів запасних білків однодольних і дводольних. Як початкові гени були використані ген гордеїну В1 ячменю і легуміна В4 бобів. Конструкцією, що містить такий химерний ген, були протрансформовані рослини тютюну і отримані трансгенні лінії.

Таким чином стає реальною можливість маніпулювання білковим складом ендосперма зернових методами генетичної інженерії.

4.7.Отримання трансгенних рослин стійких до стресових дій

Не дивлячись на безперервне вдосконалення методів культивування посівів, вони завжди піддаються екстремальним впливам навколишнього середовища, таким, як засуха, дії високих або низьких температур, що приводить до значних втрат продукції. Крім того, тривала обробка одних і тих же площ або посів монокультури веде до різних змін ґрунту. Так, наприклад, рясно зрошувані ґрунти настільки сильно засолюються, що концентрація солей в них досягає токсичного рівня. Тому використання сортів рослин, толерантних до стресових дій, має велике сільськогосподарське значення.

Багато з адаптивних реакцій рослин на стрес включають високоспеціалізовані морфологічні ознаки, такі, як, наприклад, редукція листової поверхні або зменшення числа устиць в умовах засухи, що приводять до затримання рослиною води. Проте такого роду морфологічні ознаки обумовлюються синхронною взаємодією безлічі різних генів. Тому доступнішими для генно-інженерних досліджень виявляються метаболітичні реакції, що безпосередньо індукувалися чинником стресу. Так, наприклад, відомо, що в рослинах, що піддаються тривалому водному стресу, накопичуються різні органічні низькомолекулярні сполуки, такі, як пролін, гліцинбетаїн і ряд інших, які служать осморегуляторами або осмопротекторами.

Було показано схожість стресової відповіді у бактерій і вищих рослин: у обох випадках в клітках відбувається синтез молекул осмопротекторів, механізмом дії яких є встановлення осмотичного балансу між цитоплазмою і навколишнім середовищем і, крім того, часткова стабілізація білків за стресових умов. Загальні метаболістичні шляхи акумуляції молекул осмопротекторів дозволили використовувати бактерії для вивчення шляхів біосинтезу осмопротекторів і використовувати гени бактерійного походження для отримання трансгенних рослин, стійких до стресів.

Як було сказано, накопичення в бактерійних і рослинних клітках вільного проліну є захисним механізмом від дії абіотичного стресу. Шлях біосинтезу проліну в бактеріях в даний час добре вивчений: перетворення глутамата на пролін здійснюється трьома ферментами, що кодується генами *proA*, *proB*, *proC*. Гени були клоновані і отримані векторні конструкції для трансформації на основі *Ti*-плазмиди, в яких гени *proA* і *proB* були поставлені під контроль сильного конститутивного промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти, який, проте, немає тканеспецифічності, і промотора (*P_{mas}*), що ініціює синтез білка переважно в корінні, що особливо важливе, оскільки саме коріння в першу чергу піддається дії осмотичного стресу. Така виборча експресія генів осмопротекторів може привести до економії енергії рослини в стресових умовах і, як наслідок, до збільшення врожайності.

Отримані трансгенні рослини здійснювали підвищений синтез і накопичення проліну, синтез, що перевищує в 4—6 разів, в контрольних рослинах. Трансгенні втечі укорінювалися і могли рости при концентрації солі в середовищі 20 г/л (350 мМ).

4.8. Отримання трансгенних рослин стійких до комах та вірусних інфекцій, гербіцидів

Використовуючи генно-інженерні методи, можливе конструювання рослин з підвищеною резистентністю до комах. Так, було показано, що бактерії *Bacillus thuringiensis* експресують інсектицидний білок-прототоксін, який, потрапляючи в кишечник комах, розщеплюється під дією протеаз до активного токсину, що приводить до загибелі шкідників.

Препарати на основі цього токсину використовувалися для обробки рослин в полі. Проте отримані препарати були нестійкими і досить швидко розкладалися, що не дозволяло розвинути у шкідників стійкість до інсектициду, тоді як продукція таких білків в рослинних клітках могла забезпечувати стійку резистентність рослин до комах.

З генома *B. thuringiensis* був виділений ген токсину I 2, а також його фрагменти, поставлений під контроль 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти, що дозволило гену I 2 експресуватися в рослинних клітках і переклонуватися в бінарний вектор. Клонований ген був інтегрований в геном рослин тютюну за допомогою Тривекторної системи. Експресія бактерійного гена в рослинних клітках була підтверджена як на рівні транскрипції, по присутності відповідної мРНК, так і на рівні трансляції, по синтезу білка-токсину. Отримані трансгенні рослини були стійкі до шкідників.

Ефективність захисту сільськогосподарських культур від шкідників була показана і на трансгенних рослинах томату, трансформованих генами ендотоксину, при цьому бактерійний білок, синтезований в тканинах рослин, забезпечував захисний ефект, порівнянний з використанням інсектицидних препаратів.

Як відповідь на дію фітопатогенів в рослинах включається цілий каскад механізмів захисних реакцій. При цьому активний імунітет рослин може проходити по двох основних напрямках: по-перше, у відповідь на інфекційну інвазію починається синтез з'єднань, що є токсичними і що обмежують життєдіяльність патогенів, що зрештою приводить до їх загибелі. По-друге, як захисна відповідь на пошкодження можуть створюватися структурні бар'єри, які запобігають надходженню і розповсюдженню патогенів, що досягається лігніфікацією клітинних стінок рослин або зміцненням клітинних стінок за рахунок глікопротеїдів багатих гідроксипроліном і інших 210 з'єднань, так званих екстенсинів, що зрештою приводить до захисту тканин від пошкодження фітопатогенами.

У відповідь на інфікування вірусами, бактеріями і грибами індуються специфічні білки PRP (pathogen related proteins), у тому числі і найбільш вивчені хитинази і Я-1,3-глюконази. Ці ферменти інгібують зростання грибів, а також деяких видів бактерій, що приводять до часткового гідролізу.

Як відповідь на дію фітопатогенів в рослинах включається цілий каскад механізмів захисних реакцій. При цьому активний імунітет рослин може проходити по двох основних напрямках: по-перше, у відповідь на інфекційну інвазію починається синтез з'єднань, що є токсичними і що обмежують життєдіяльність патогенів, що зрештою приводить до їх загибелі. По-друге, як захисна відповідь на пошкодження можуть створюватися структурні бар'єри, які запобігають надходженню і розповсюдженню патогенів, що досягається лігніфікацією клітинних стінок рослин або зміцненням клітинних стінок за рахунок глікопротеїдів багатих гідроксипроліном і інших 210 з'єднань, так званих екстенсинів, що зрештою приводить до захисту тканин від пошкодження фітопатогенами.

У відповідь на інфікування вірусами, бактеріями і грибами індуються специфічні білки PRP (pathogen related proteins), у тому числі і найбільш вивчені хитинази і Я-1,3-глюконази. Ці ферменти інгібують зростання грибів, а також деяких видів бактерій, що приводять до часткового гідролізу їх клітинних стінок.

Оскільки раніше експериментально вже був показаний антимікробний ефект хитиназ і глюконаз, а також що ці білки кодується одиночними генами, гени хитинази і глюконази були використані в генно-інженерних роботах по отриманню трансгенних рослин, стійких до фітопатогенів. Були отримані трансгенні рослини тютюну і турнепсу, що несуть ген хитинази під контролем промотора 35S. У цих рослин спостерігалася стійкість до грибної інфекції, причому не тільки в лабораторних, але і в польових випробуваннях. Крім того, було показано, що захисні ефекти хитиназ синергидно підвищуються одночасною дією глюконаз, таким чином, трансгенні рослини з обома цими генами матимуть великий агрономічний ефект.

У процес контролю за вірусною інфекцією рослин історично було залучено велике число різних підходів. В результаті тільки сумісне комбінування різних методів могло принести результати по отриманню рослин, стійких до вірусної інфекції. За останні роки був зроблений в цьому напрямі помітний ривок, що безпосередньо пов'язане з детальнішим розумінням організації генома і функціонуванням вірусних генів. В даний час для отримання рослин, стійких до вірусної інфекції за допомогою генно-інженерних технологій, існує ряд методик, що дозволяють отримати трансгенні рослини, трансформовані геном оболонки вірусу, що приводить до зменшення інфікованості і інгібуванню розмноження вірусу. Таким методом були отримані рослини тютюну і картоплі, трансформовані геном оболонки вірусу тютюнової мозаїки, що привело до появи стійкого антивірусного ефекту у трансгенних рослин.

Інші методи отримання трансгенних рослин, стійких до дії фітовірусів, включають експресію генів антивірусних антитіл, вірусних сателітів РНК, антисенсних послідовностей.

Інтересним здається приклад антивірусного ефекту від трансформації рослин геном людського інтерферону. Білок інтерферону є одним з ключових білків індукції імунітету у ссавців, яка в принципі відрізняється від такого у рослинних організмів. Друга рамка прочитування ДНК вірусу мозаїки цвітної капусти була замінена на кодуєчу послідовність гена І-РНК людини. Трансформація турнепсу такою векторною конструкцією привела до продукування біологічно активного інтерферону в клітках рослин, що різко підвищило стійкість до вірусу жовтої мозаїки турнепсу. Ген людського інтерферону був також введений в геном тютюну і картоплі. Отримана значна стійкість трансгенних рослин до вірусних фітопатогенів.

Одним з основних напрямів біотехнології рослин є отримання культурних рослин, стійких до дії гербіцидів. Гербіциди широкого спектру дії, знищуючи бур'яни, надають пригноблюючу дію і на посіви. Отримання стійких до гербіцидів рослин ведеться в двох напрямках: по-перше, пряма селекція резистентних до гербіцидів форм мутантів рослин, по-друге, отримання трансгенних рослин шляхом введення генів гербіцид-резистентності будь-якого походження, як бактерійного, так і рослинного.

Методами клітинної селекції були отримані лінії мутантів петунії, в 20 разів стійкіші до гербіциду гліфосату. Також селективні суспензійні клітинні лінії люцерна, здатна рости у присутності 600 мкМ гербіциду фосфінотрицина, тоді як клітки дикого типу інгібуються концентрацією 25 мкМ.

Отримання рослин, стійких до гербіцидів методами генної інженерії, перш за все ґрунтується на вивченні механізмів толерантності і включає наступні етапи: виявлення мішеней дії гербіцидів в клітці рослин, відбір рослин, стійких до даного гербіциду як джерело генів резистентності, ідентифікація і клонування цих генів, вивчення їх експресії для використання в трансгенних конструкціях.

В більшості випадків біохімічною мішенню дії гербіцидів є фізіологічні процеси — фотосинтез або біосинтез амінокислот. Так, гербіцид паракват, індукуючий ксенобіотичний стрес, і гербіциди діфінілефірного ряду, у тому числі і ацифлуорфен, володіють гербіцидною активністю завдяки здатності інгібувати фотосинтез за рахунок активації вільних радикалів кисню. Супероксид дисмутаза, що кодується геном SOD, каталізує дісмутацію супероксидів в молекулярній кисень O_2 і пероксид водню H_2O_2 . Була отримана ДНК гена SOD з тютюну і під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти була введена у складі вектора на основі Ті-плазмиди в геном люцерни. Крім того, векторна конструкція містила специфічний транзитний пептид для проникнення безпосередньо в хлоропласти люцерни, біохімічні процеси в яких і були безпосередньою мішенню дії гербіцидів. Аналіз рослин трансформантов показав збільшення стійкості до дії гербіцидів ацифлуорфена і параквату, що значно перевершує таку у нетрансформованої люцерни.

Інший гербіцид — гліфосат — пригноблює зростання рослин, перешкоджаючи біосинтезу ароматичних амінокислот шляхом придушення ферменту енолпірувил шикимат трифосфат синтетази. У *Salmonella typhimurium* цей фермент кодується геном ago A. Мутантний ген ago A, у якого в результаті точкової мутації відбулася заміна триплетів серину, що кодують амінокислоту серин на амінокислоти гліцин, призводить до зниження скріплення гербіциду гліфосату з ферментом. Була проведена трансформація рослин тютюну векторними конструкціями, що містять ген мутанта. Отримані трансгенні рослини володіли підвищеною стійкістю до гербіциду. Приведені дані свідчать про перспективність створення трансгенних рослин, стійких до гербіцидів.

Контрольні запитання:

В чому полягають основи методів селекції?

Яким чином можна проводити селекцію, перерахуйте її типи?

За допомогою яких чинників можна покращити стан культури?

Які чинники впливають на створення трансгенних рослин?

Тема 5. Перспективи біотехнології культур клітин тварин

5.1 Історія культивування тваринних кліток

Історія використання крупномасштабних культур клітин тварин. Основні напрямки біотехнології тваринних клітин, як продуцентів вторинних метаболітів – лікарських препаратів: протиракових вакцин, імунорегуляторних матеріалів, інтерферонів, моноклональних антитіл, ферментів та гормонів.

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 ХХ століття. Після того, як стало відомо, що подібні процеси реальні, наступив другий етап робіт, початок якому поклала демонстрація можливості вирощування і репродукції в таких клітках інфекційних агентів—вірусів, що фільтруються. Третій етап історії починається з часу, коли була показана практична можливість отримання в клітках тваринних великих кількостей вірусного матеріалу для застосування у вакцинних препаратах, і тягнеться до часу, коли: 1) стало можливим вставити в клітки специфічні екзогенні одержані гени і одержати їх експресію і 2) підтверджена можливість вирощування в культурі з одиночної клітки цілої популяції. Коли такі популяції одержували з клітки, що виділяла в навколишнє середовище антитіла, то всі молекули антитіл в надосадочної 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 кліток тварин рости і ділитися в культурі, потрібно було оволодіти рядом підходів і методик. Особливості їх приведені нижче.

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

Наукову основу для розробки цих методик складає уявлення про клітку як основний структурний елемент живих організмів тваринного і рослинного походження. Ідея про те, що клітки 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. Клітка поза організмом тварини теж прагнути підтримувати свої внутрішні умови. Якщо відмінності між внутрішніми і зовнішніми умовами будуть незначними, то висока вірогідність зростання і розподілу клітки. 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, що

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 безперервного культивування *ін витро* та підтримка 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 тваринні клітини мають можливість зберігати свої внутрішні умови, ділитися поза організмом.

1898 рік Лінггерн показав що клітини шкіри людини можна зберігати в життєздатному стані в кислому середовищі, які можуть бути реімплантовані.

1912 рік інкубація клітин курячого серця ембріону на протязі 34 років шляхом пересівів. У 1961 рік Мурхед виділили диплоїдну лінію клітин людини. Клітини які виділені з ракових клітин є безсмертними (гетероплоїдні), а ніші клітин людини при відмиранні залишалися диплоїдними. Продовжуючи роботи Ру Рос Харрісон удосконалив методику «висячої краплі». Він використовував невеликі шматочки тканини, відторгнуті від медулярної судини жаби до упродовження в її лімфатичний тромб, і витримував їх у вигляді краплі на нижній стороні покривного скла, розташованого поверх поглиблення в наочному склі. У 1907 р. йому вдалося спостерігати за допомогою такої «камери» зростання нервових клітин протягом декількох тижнів; він встановив, що швидкість росту цих кліток складає 20 мкм за 25 мін. Тоді як експерименти Харрісона були направлені на те, щоб одержати відповіді на питання, що відносяться до фізіології нервових клітин жаби, методика, яку він користувався, була застосована Барроузом для інших кліток тканин теплокровних тварин. Цей дослідник в 1910 р. замість лімфатичного тромбу використовував тромб плазми курки.

У 1913 р. Алексис Каррель застосував плазму крові, що збагатить екстрактом ембріона. Додаток такого екстракту прискорювала зростання тканин. Застосована методика забезпечувала значно велику 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» кліток. Інкубація кліток серця курячої ембріона була засади 17 січня 1912 р. Пересівання кліток продовжило 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 проводяться, були дуже громіздкими. Асистенти Карреля були одягнені в довгополі гумові халати темного кольору 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 кліток, використовуючи хірургічну техніку для відторгнення 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 кліток.

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 клітками тварин Канті, що діляться, в 1928 р. розробив метод кинофотомікрографії. У цей же період був розроблений додатковий і дуже істотний підхід в техніці роботи з клітками. Мається на увазі застосування трипсину для звільнення кліток 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 клітки, а не тканини.

Вперше клони кліток в культурі з одиночної клітки були одержані Ерлом із співробітниками в 1948 році. Голок (1955) систематично досліджував харчові потреби кліток в умовах. Доти поки в 1961 р. Хейфлік і Мурхед не виділили лінію диплоїдних кліток людини (ПДВ) WI-38, вважалося, що один раз стала клітинна лінія має необмежений час життя. Щодо лінії WI-38

було показано, що період її існування в культурі обмежується приблизно 50 подвоюваннями популяції. Перед відмиранням популяції для кліток цієї лінії характерний феномен старіння. Проте при відмиранні ці клітки залишалися диплоїдними і не мали ознак злоякісних змін. Клітки, виділені з ракових пухлин або трансформовані в ході культивування, характеризуються «безсмертністю» і корелюють з гетероплоїдністю. Перші суспензійні культури кліток тварин, як правило, ґрунтувалися на клітках злоякісних тканин. Це — клітки HeLa, виділені з ракової пухлини шийки матки людини. Лінія карциноми шийки матки, що переживається, була виділена ще в 1952 році Джем із співробітниками, вона використовується і в даний час в багатьох лабораторіях миру.

Подальший етап в історії культивування диплоїдних кліток людини пов'язаний зі встановленням факту, що вони є генетично стабільними і вільними від всіх відомих латентних і онкогенних вірусів. Тому лінії диплоїдних кліток 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 клітках, 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 профільтований 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.

Характеристика продуктів які отримують з клітин тварин:

- віруси вакцин (герпесу; поліомієліту, протикору, проти свинки, проти крастуні, проти бішенства, проти жовтої ліхорадки, проти грипу, проти віруси герпесу, проти цитомегаловірусу, проти аденовірусу, проти кліщового інцефаліту); антитіла; інтерферони; ферменти; цільні клітини; інсектициди; імунорегулятори; гормони; фактори росту.

Віруси вакцин

Заміняють цілі організми тварин та клітини. Першою вакциною є вакцина проти поліомієліту. Для цього використано нирки мавпи. Після виділення лінії диплоїдних клітин людини стали використовувати клітин людини, як безпечніше. Треба враховувати онкогенність клітин для їх безпечності. На тепершній 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 суб'єдиничній 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 популярним є тромболітичні ферменти. Тромбоемболія — складне захворювання. Тому необхідно рано діагностувати його та лічити фібрінолітичними ферментами - стрептокіназою, яка уявляє собою білок бактеріальний та урокіназою - білок виділений з сечі людини. Ці ферменти розкладають згусток крові а також фактори коагуляції крові.

5.2. Гомони та фактори росту

Існує декілька ліній клітин, які виділяють гормони. Багато гормонів виділено з клітин — ендокринних пухлин, але пізніше визначено що гормони можуть вироблятися клітинами епітеліальними та ендотеліальними. Зараз ведуться роботи про отримання гормону інсуліну з клітин мишинних та клітин підшлункової залози поросятка з метою отримання гібридних клітин.

Багато гормонів отримують з пухлинних клітин. Гормон людини клонований в ген кишкової палички, але зараз його отримують з гіпофізу людини, з якого він екстрагується.

Клітини та клітинні компоненти

Для того щоб мати велике джерело органел клітин – хромосом або ДНК, попередники РНК, рибосоми, мітохондрії, та компоненти клітинних мембран (атигени, білки прикріплення.) іноді потрібні отримувати самі клітини.

Крім того цільні клітини можна використовувати в хімічні трансформації, розщепленні ферментів або синтезі метаболітів і в системах кількісного аналізу при скринінгу та токсикологічних дослідженнях.

Продукт який отриманий з тваринних клітин треба опробувати та розрішити для широкого використання:

1. Для збільшення продуктивності треба збільшити масштаби та підвищити ефективність систем культивування;
2. Підвищити вихід на основі кращого уявлення та цілеспрямованого використання механізмів синтезу продуктів в клітинах;
3. Виділення нових ліній клітин.

5.3.Генна інженерія в тваринництві

Розвиток молекулярної генетики, що дозволяє цілеспрямовано використовувати ДНК, як носія генетичної інформації, відкриває тваринництву нові перспективи. Застосування методів генної інженерії в тваринництві дає підставу прогнозувати, що традиційні методи розведення тварин будуть доповнені і навіть замінені новими технологіями.

Тварин, що несуть в своєму геномі рекомбінантний (чужорідний) ген, визначають як трансгенних, а що інтегрувався в геном реципієнта ген — як трансген. Продукт цього гена — быллок—являється трансгенним продуктом.

За допомогою перенесення генів при синтезі рекомбінантних білків можна добитися зміни деяких властивостей організму, додати йому нові якості. При передачі трансгена по спадку потомству можливе створення трансгенних ліній тварин.

Після вибору і придбання необхідної генної конструкції отримання трансгенних сільськогосподарських тварин можна розділити на наступні етапи:

1. Приготування розчину ДНК для мікроін'єкції.
2. Підготовка донорів і витягання ембріонів.
3. Візуалізація пронуклеусов в ембріонах сільськогосподарських тварин і мікроін'єкція ДНК.
4. Пересадка ін'єктованих ембріонів в яйцепроводи або (після проміжного культивування) в матку синхронізованих реципієнтів.
5. Доказ інтеграції у потоків, що народилися, і, якщо можливо, перше дослідження експресії трансгена на рівні транскрипції (РНК) і трансляції (протеїн).
6. Отримання трансгенних нащадків з використанням методів традиційного тваринництва.
7. Приготування розчину ДНК для мікроін'єкцій. У розчині ДНК для мікроін'єкції повинні бути відсутніми механічні домішки, які можуть викликати закупорювання ін'єкційної піпетки або пошкодження кліток, що ін'єктуються. Розчини, дотичні з ДНК, заздалегідь стерилізують, а посуд ретельно промивають. Кінцеву концентрацію ДНК встановлюють так, щоб в 1 пкл ін'єкційного розчину містилося більше 100 копій генної конструкції.

Зазвичай використовують розчин з концентрацією 1000 копій в 1 пкл. Для фрагментів ДНК завдовжки від 5 до 8 кб в 1 мл містяться 100 копій при концентрації 1—2 мкг/мл. Зв'язок між кількістю ДНК, що ін'єктуються, і числом копій, що інтегрувалися, не виявлений. Готовий для ін'єкції розчин ДНК зберігають в замороженому стані.

Частота інтеграції при отриманні трансгенних тварин методом мікроін'єкції залежить від наступних чинників: очищення ін'єкційного розчину; форми ДНК (кільце, лінійна); виду кінців (тупі або нерівні); концентрації ДНК; буферного розчину.

Таким чином, вже від приготування ін'єкційного розчину залежить ефективність отримання трансгенних тварин.

5.4. Введення кліток в культуру, їх походження

Відповідно до цілей і задач експериментальної роботи можна виділити два напрями культивування тваринних кліток:

- культури кліток;
- культури органів і тканин (органні культури).

Культури кліток позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістеотипічну архітектуру і пов'язані з нею біохімічні ознаки і звичайно не досягають рівноважного стану за відсутності спеціальних умов. Клітки в культурах розмножуються, що забезпечує отримання великої маси кліток, потім їх ідентифікують (по фенотипічних ознаках, шляхом вирощування в селективному середовищі), розділяють на ідентичні паралелі і, якщо це необхідно, зберігають. Динамічні властивості культивованих кліток часто важко контролювати, також важко реконструювати *in vitro* деякі клітинні взаємодії, спостережувані *in vivo*. У зв'язку з цим деякі дослідники вважають за краще використовувати клітинні системи, що зберігають структурну цілісність початкової тканини.

Список типів кліток, які вже введені в культуру, достатньо великий. Це елементи сполучної тканини людини (фібробласти), скелетні тканини (кістка і хрящі), скелетні, серцеві і гладкі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки і ін.), клітки нервової системи, ендокринні клітки (надниркові, гіпофіз, клітки острівців Лангерганса), меланоцити і різні пухлинні клітки.

Популяція кліток не завжди гомогенна і володіє фіксованим фенотипом. Деякі культури, наприклад, кератіноцити епідермісу, містять стовбурні клітки, клітки-попередники і кератинізовані лускові клітки. У такій культурі відбувається постійне оновлення за рахунок стовбурних кліток, проліферація і дозрівання кліток-попередників, а також необоротне диференціювання, що супроводжується "слущиванием" лускових кліток в культуральне середовище.

Яку тканину краще брати для введення в культуру, дорослу або ембріональну, нормальну або пухлинну? Культури, одержані з ембріональних тканин, характеризуються кращим виживанням і активнішим зростанням в порівнянні з відповідними зрілими тканинами. Причиною цього служить низький рівень спеціалізації і наявність реплікуючих кліток-попередників в ембріонах. Проліферативна здатність дорослих тканин нижча, вони містять більше спеціалізованих кліток, що не діляться. Отримання первинних культур кліток дорослих тканин і їх розмноження є складнішою задачею, тривалість життя таких культур, як правило, невелика. Нормальні тканини дають початок культурам з обмеженим часом життя, тоді як культури, одержані з пухлин, здатні проліферувати необмежено довгий час. Диференціювання нормальних кліток в культурі супроводжується звичайно повним припиненням проліферації кліток. У культурах пухлинних кліток можливе часткове диференціювання при збереженні здібності до проліферації.

Свіжовиділені культури носять назву первинних культур до початку пасивування або субкультивування. Клітки первинної культури звичайно гетерогенні і характеризуються низькою проліферацією. У них якнайповніше представлені типи кліток тієї тканини, звідки вони були одержані. Пасивування забезпечує можливість продовження існування культури, можливість клонування, дослідження і збереження властивостей кліток. При цьому виходять однорідніші популяції, а також втрачаються спеціалізовані клітки. Після декількох пересівів лінія кліток або гине, або трансформується і стає постійною клітинною лінією. Властивістю "бессмертності" володіють в основному клітки, одержані з пухлин. Поява постійної лінії кліток констатується по морфологічних змінах (зменшення розміру кліток, зниження їх адгезивності, округлення, збільшення ядерно/цитоплазматичного відношення, по збільшенню швидкості росту (час подвоєння кліток в культурі знижується з 36 - 48 до 12 - 36 годин), по зниженню залежності від

сироватки, по збільшенню ефективності клонування, по зниженню залежності від субстрата, по збільшенню гетероплоїдності (хромосомні відмінності між клітками) і анеуплоїдності і по збільшенню опухолеродності. Нормальні клітки можуть трансформуватися в постійну лінію, не стаючи при цьому злоякісними.

5.5. Характеристика кліток, культивованих *in vitro*

Клітки одного і того ж типу в тканині взаємодіють один з одним і погоджують швидкість розподілу, щоб підтримувати належну густину популяції. «Соціальний» контроль такого роду чітко виявляється при реакціях на пошкодження. Наприклад, коли пошкоджений епітелій, клітки по краях рани стимулюються до розподілу і на повзання на голу поверхню до тих пір, поки вона знов не буде закрита; у цей момент швидка проліферація і рух кліток припиняються. Схоже явище можна спостерігати на дисоціюючі клітках в культурі. Епітеліальні клітки або фібробласти, поміщені в чашку, у присутності сироватки «приклеюватимуться» до поверхні, розпластуватимуться і ділитимуться до тих пір, поки не утворюється суцільний моношар, в якому сусідні клітки стикаються.

Адгезивні контакти забезпечуються утворенням комплексів з поверхневих рецепторів мембрани клітки. В результаті поперечного руху глікопротеїдів в мембрані утворюються електроплотні бляшки глікопротеїнових комплексів. Такі бляшки формуються у відповідь на дію антитіл, що аглютинують агентів (лектини) або сусідніх кліток. При адгезії субстрат діє як багатовалентне антитіло, а бляшки, що утворюються, називають «адгезивними плямами». Ці плями багаті «адгезивними білками» і завжди виділяють елементи цитоскелета, які утримують глікопротеїди. Завдяки такій дії зменшується «розрідження» мембрани, і клітка оберігається від округлення. Адгезивні плями, що утворилися на клітці, формують виступи, за допомогою яких і відбувається переміщення. Виступи цитоплазми (ложноніжки, псевдоподії) при контакті з сусідньою мембраною інгібують рух. Клітки в цьому випадку направляють свої псевдоподії в іншому напрямі (феномен контактного інгибування). Коли культура стане монослоєм, активність ложноніжок і рух кліток припиняється. Нормальні клітки перестають ділитися, це явище, відомо як гальмування проліферації, залежне від густини. Якщо такий моношар «поранити» голкою так, щоб на чашці утворилася вільна від кліток смужка, клітки з країв цієї смужки починають просуватися на вільне місце і ділитися. Спочатку такі явища пояснювали тільки контактним гальмуванням клітинного розподілу, але це, мабуть, не відображає суті справи.

Густина клітинної популяції, при якій клітки в суцільному моношарі перестають ділитися, збільшується з підвищенням концентрації чинників зростання в середовищі. Крім того, виявилось, що якщо культуральна рідина протікатиме по поверхні чашки з острівцями кліток, то клітки, омивані середовищем, що тільки що пройшло над іншими клітками, ділитимуться повільніше, ніж ті, які омиваються середовищем, що пройшло над вільними від кліток ділянками. У середовищі, що протікало над клітками, бракує якихось важливих живильних речовин або чинників зростання.

Чинник зростання звичайно присутній в середовищі в концентрації близько 10^{-10} М (зразково одна молекула в об'ємі сфери діаметром 3 мкм). Один фібробласт має близько 105 рецепторів чинника зростання, кожний з яких володіє дуже високою спорідненістю до нього. Таким чином, у кожної клітки досить рецепторів, щоб зв'язати всі молекули ростових чинників в об'ємі сфери діаметром близько 150 мкм.

Крім того, вважають, що значна частина чинника зростання, зв'язаного рецепторами клітинної поверхні, швидко поглинається шляхом ендоцитоза і руйнується. З цього ясно, що сусідні клітки конкурують між собою за щонайменші кількості чинників зростання. Такого роду конкуренція важлива як для кліток в тканині, так і для культивованих кліток, вона запобігає зростанню популяції вище за деякий рівень її густини.

Конкуренція за чинники зростання і живильні речовини не єдиний чинник, що впливає на швидкість розподілу в клітинній культурі. Форма кліток під час їх розпластування і руху по поверхні субстрата на вільні місця теж сильно впливає на їх здатність ділитися. При культивуванні

нормальних кліток в суспензії, коли вони не прикріплені до твердої поверхні і тому мають округлу форму, вони майже ніколи не діляться (залежність розподілу від прикріплення). Вплив розпластування кліток на проліферацію можна продемонструвати при вирощуванні кліток на субстратах з різної адгезивністю поверхні або на таких субстратах, де є лише крихітні адгезивні ділянки, на яких клітка може прикріплюватися, але не може розпластатися. Частота ділення клітин зростає із збільшенням ступеня їх розпластування. Можливо, що сильно розпластані клітки можуть уловлювати більше молекул чинника зростання і поглинати більше живильних речовин завдяки своїй більшій поверхні.

Проте деякі типи кліток, майже не здібні до проліферації в суспензії, охоче діляться, як тільки їм вдається вступити в контакт з ділянкою субстрата, навіть якщо ця ділянка настільки мала, що клітка не може на ньому розпластатися. Такі «фокальні» контакти є місцями з'єднання (хоча і непрямого) внутріклітинних актинових філаментів з молекулами позаклітинного матриксу. Ці і інші спостереження безумовно наводять на думку, що контроль клітинного розподілу яким-то чином пов'язаний з організацією цитоскелета. Хоча механізм і функції цього зв'язку не ясні, можна думати, що залежність ділення клітин від їх прикріплення, ймовірно, дозволяє тканини зберігати цілісність і запобігає проліферації кліток, що відокремилися від нормального оточення. Цикл прикріплення і відкріплення, ймовірно, дозволяє перегрупувати адгезивні контакти як між клітками, так і між клітками і матриксом, щоб вбудувати знов виниклі дочірні клітки в тканину, перш ніж вони зможуть почати наступний цикл розподілу. Ослаблення контактів, мабуть, складає важливу особливість проліферативного поведінки більшості типів кліток. Наприклад, в ранній стадії реакції фібробластів на ростовий чинник наголошується руйнування їх фокальних контактів. Втрата керованості зростання у ракових кліток майже завжди пов'язана з необоротним зменшенням клітинної адгезивності, яке виявляється також у втраті фокальних контактів при вирощуванні таких кліток в культурі.

Зміна ростових властивостей культивованих кліток називається трансформацією. Трансформація — процес необоротний і, очевидно, включає генетичні зміни в тій специфічній частині спадкової інформації, яка контролює неопластичний фенотип, що додається до трансформованого генома господаря. Зміна ростових властивостей є однією з адаптивних особливостей, дозволяючої кліткам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих кліток. Таким чином в умовах, які обмежують зростання нормальних кліток, трансформовані клітки ростимуть до вищої густини популяції, що буде пов'язано з їх зниженою потребою в чинниках зростання. Існують докази, що основна зміна при трансформації пов'язана із зміною транспорту живильних речовин через клітинну мембрану, а це, у свою чергу, може зробити клітки менш залежними від «геометричних» чинників зростання.

Трансформовані клітки здатні рости в умовах, в яких геометричні характеристики, а саме відношення площі поверхні до об'єму менш сприятливі. Отже, трансформовані клітки ростимуть в суспензійних культурах, утворюючи сферичні клони. Так, трансформовані клітки, будучи введеними імунологічно толерантним тваринам у відносно невеликих кількостях, можуть утворювати пухлини. З цієї причини трансформація іноді прирівнюється до злоякісних змін. Трансформація може бути або вірусною, або «спонтанною». Більшість досліджень виконана з клітками, підданими вірусній трансформації. Коли при цьому використовували добре відомі трансформуючі віруси, такі, як віруси SV40 і поліноми, то властивості трансформованих кліток виявлялися дуже наочно і були описані детально. Аналогічні зміни, що спостерігалися після спонтанної трансформації, привели до припущення, що така трансформація є результатом активації послідовностей генів (онкогенною), вже присутніх в геномі трансформованої до цього клітки, схожої з такою у вірусному геномі. Багато досліджень підтвердили, що спонтанно трансформовані клітки мають таку ж послідовність підстав в ДНК, як і в клітках, трансформованих вірусами. Але в одній з робіт було показано, що аналогічні (можливо, невиразні) зміни викликаються також точковими мутаціями в нормальних генах. Старіння характерне для кліток, що мають обмежений потенціал проліферації, тобто низьку густину насичення за ідеальних умов культивування. Прикладом можуть служити лінії диплоїдних кліток людини. Підвищена здібність

до зростання трансформованих кліток означає, що трансформація переважає над процесом старіння.

Старіння, безумовно, залежить від генетичних чинників, оскільки кожен вигляд має характерну тривалість життя, але варіабельність усередині популяцій по цьому показнику свідчить також про вплив фенотипа. При адаптації диплоїдних кліток людини (лінія WI38) вже із самого початку було показано, що культивовані клітки можуть проявляти феномен старіння і мають обмежений час життя (50 ± 10 подвоювань популяції). Залежні від віку зміни, які при цьому спостерігалися, включали подовження межмитотичних інтервалів ($19 \pm 25\%$ — $31 \pm 41\%$ /час), зміна метаболізму, рівнів ферментів і експресії продукту. Слід зазначити, що не встановлено чіткого зв'язку між тривалістю життя залежно від походження клітки (миша, людина) і потенціалом здвоєння їх кліток в культурі. Обмежені за тривалістю життя клітинні лінії, наприклад лінії диплоїдних кліток фібробластів, не є ідеальними об'єктами для цілей виробництва, оскільки їх повинні використовувати до того, як в клітках відбудуться серйозні зміни старіння. У практичних відносинах це означає, що період життя цих кліток, коли їх можна застосовувати в цілях виробництва, полягає між 12 і 30 пасажами (у першому випадку — для приготування посівного матеріалу). Трансформовані ж клітки не мають обмеженої тривалості життя, і це обумовлює таку їх перевагу в біотехнології, як використання як субстрат для генерації різних продуктів в поєднанні з вищою густиною популяції кліток, вищими швидкостями росту і здатністю рости в суспензіях.

Контрольні запитання:

1. Яким чином трансформація впливає на стан життя клітин?
2. Як відрізняють по структурі ДНК спонтанно трансформовані клітки як і клітки, трансформовані вірусами?
3. Які зміни виникають у культури кліток позбавлені структурної організації?
4. Яким чином забезпечуються адгезивні контакти ?

Тема 6 Отримання та використання лімфоцитних гібридом

6.1. Сутність процесу

Передачі генетичної інформації між клітками можна досягти шляхом штучно індуцируючого злиття їхніх клітинних мембран. Основною метою злиття соматичних кліток з відповідними клітинними лініями є генерація стабільних гібридних кліток, які довговічно виконують специфічні функції, що проявляються нормальними диференційованими клітками. У цей час найбільший успіх у практичному застосуванні принципу гібридизації соматичних кліток досягнуто в області технології лімфоцитних гібридом, запропонованої в 1975 р. Кьолером і Мільштейном. Ця технологія відкрила нову еру в імунології. У результаті злиття між клітками В-лімфоцитів і клітками мієломи утворюються гібридні клітки (гібридоми), що виділяють моноклональні антитіла заздалегідь певної специфічності. Одержувані лінії кліток є клонованими довговічними, що гарантує моноклональність і постійну придатність вироблюваних ними антитіл. На практиці виробництво будь-яких антитіл, синтезованих імунізованими тваринами, при застосуванні кліток, що злилися, може бути зроблено безперервним і, по суті, невичерпним. Значення моноклональних антитіл як імунологічних реагентів є загальновизнаним тому що вони застосовуються не тільки в області імунології і логічних досліджень, але фактично у всіх областях біомедицини. Потреби у моноклональних антитілах зі специфічними характеристиками, наприклад, у підкласі імуноглобулінів, що володіють особливою сполучною спорідненістю й дуже точною специфічністю, постійно ростуть. Злиття, активованих Т-лімфоцитів з Т-клітинами пухлинних клітинних ліній привело до одержання Т-Кліток із практично нев'янучими функціями. У даній главі

розглянуті основні принципи генерації гібридом В-Кліток і стадії відповідних процесів, а також методи одержання й застосування моноклональних антитіл.

6.2. Імунізація

Першою стадією в одержанні лімфоцитних гібридом є генерація активованих імунних В-лімфоцитів, що служать партнерами злиття для кліток мієломи. Було показано, що після імунізації *in vivo* число гібридів, що з'являються в результаті злиття кліток, безпосередньо пов'язане із числом свіжостимульованих великих лімфоцитів у межах селезінки перед злиттям і що процедури імунізації повинні бути спрямовані скоріше на генерацію активно діляться В-Лімфоцитів, чим на диференціацію кліток у протоплазмі. Хоча в цей час механізми імунізації пізнані ще не повністю, проте звичайно зізнається, що основне значення в Досягненні належного злиття кліток мають таких факторів, як природа, доза й спосіб введення антигену, а також шляхи й режими імунізації. Природа імунізуючого антигену (білок, ліпід або вуглевод), а також форма, у якій він представлений, впливають на реакцію імунізуючої тварини. Незважаючи на те що чистота імуногена *per se* не змінює суть справи, вона може виявитися важливою, якщо недостатньо очищений матеріал викликає ослаблені відповідні реакції організму і якщо техніка скринінга не може зробити розходжень між антитілами до специфічних компонентів і антитілами до домішок. У цілому комплексированні або спеціальні форми антигенів, подібні до поверхневих антигенів кліток і мікроорганізмів, є високоімуногенними, у той час як розчинні антигени у водяних розчинах володіють, як правило, слабкою імуногенністю. Для посилення антигенності таких антигенів є різні підходи. Наприклад, їх можна «посадити» на розчинні або корпускулярні носії або ввести разом з ад'ювантами. Зокрема, для цього широко використовують повен або неповний ад'ювант Фрейнда.

Критичне значення може мати вигляд, у якому представлений антиген. Було показано, що мономерні форми глікопротеїнів мікроорганізмів або вірусів є дуже слабкими або взагалі неефективними як імуногени, у той час як багатомірні форми цих же білків можуть володіти високою імуногенністю. До числа таких багатомірних форм ставляться ліпосоми і білкові міцели. Недавно була описана новітня структура для цієї мети, що володіє вираженою імуногенністю,— так званий імуностимулюючий комплекс.

Дуже виражені імунні реакції можна одержати при дозах антигену менш 1 мкг, у той час як відповідно до загальноприйнятих рекомендацій при імунізації потрібно вводити за одну інокуляцію від 10 до 100 мкг антигену. Імунізація звичайно здійснюється в такому режимі, при якому тварина спочатку «підготовляється» за допомогою серій внутрім'язових, підшкірних або внутрішньочеревинних інокуляцій, а потім після відпочинку протягом не менш 4 тижнів повторно імунізуються внутрішньо або внутрібрюшинно за 3–4 доби перед злиттям. Хоча моноклональні антитіла з потрібною специфічністю можна одержати після коротких процедур імунізації, такі прийоми приводять здебільшого до вироблення антитіл щодо низької спорідненості. Чим довші процедури імунізації й чим більше шляхів вони охоплюють, тим більше може знадобитися реімунізація і, отже, більше буде витрата антигену. Однак повторні реімунізації у більшості випадків не індуціюють появи заново реагуючих клонів лімфобластів. Вони можуть навіть прогресивно знижувати первинну реакцію. Тільки по закінченні певного періоду спокою, що триває кілька тижнів або навіть місяців, клони знову стають здатними реагувати.

На рівень імунної відповіді може впливати також шлях інокуляції. Відносно слабкі імуногени можуть викликати достатні імунні реакції, якщо вони вводяться в певному режимі (наприклад, у м'якушку підшви в мишей).

Важливе значення має вибір штамів мишей і пацюків, використовуваних для імунізації, тому що реактивність певних штамів до антигенів може контролюватися генетично. Тому миші *Balb/c* або пацюка *LOU*, найбільше часто використовувані з метою імунізації, не у всіх випадках будуть кращими об'єктами для одержання потрібних реакцій на певні антигени. І якщо реакції слабкі, те варто розглянути можливість застосування цих же тварин, але інших ліній. Перед тим як здійснити процес реального злиття, завжди бажано проконтролювати тварин на наявність сироваткових

антитіл проти даного антигену. Це дозволить одержати дані про те, чи дасть імунізація потрібну реакцію й чи треба проводити заключний серологічний скринінг системи, що призначається для селекції гібридних клонів.

Недавно були описані різні режими процедур імунізації *in vitro*, що дозволяють просто й швидко проводити індукування бластогенних реакцій у мишачих спленоцитах, що призначаються для клітинної гібридизації з метою продукування клітинних гібридом. Такі процедури мають деякі переваги перед процедурами імунізації *in vivo*. При відносно невеликих кількостях постійно доступного антигена можна легко створити за кілька діб індукцію бластоїдних кліток *in vitro*. Можливо також індуціювати *in vitro* відповідні антитіла до аутоантигенам або іншим слабким імуногенам, одержати які методами імунізації *in vivo* не такто просто. Крім того, на додаток до антигенних факторів для індукування бластогенних реакцій в В-клітках *in vitro* можна використовувати активатори поліклональних В-кліток. Злиття таких кліток із клітками міеломи може приводити до одержання гібридом, здатних реагувати з різними антигенами. Привабливість використання для генерації активованих В-Лімфоцитів людини методів *in vitro* очевидна. Первинні й вторинні реакції В-Кліток людини після стимуляції антигену *in vitro*, оцінювані по рівнях антитіл, що утворюються, були описані для багатьох антигенів. Нарешті, було показано, що збільшення числа кліток, що утворюють антитіла, приблизно в 80 разів може бути досягнуто пересадженням опроміненим реципієнтам кліток селезінки імунізованих мишей, що розмножується статевим шляхом, і наступної рестимуляції їхнім антигеном. Найбільш високе збільшення кількості таких кліток можна забезпечити шляхом пересадження кліток селезінки, недавно рестимульованих мишей опроміненим реципієнтам, уводячи цим реципієнтам антиген на нульовий і четвертий дні після пересадження й збираючи селезінки після сьомої доби інкубації.

6.3. Злиття партнерів

У гібридомній технології, як це було спочатку розроблено, безсмертність лімфобластоїдних кліток, секретуючих імуноглобулін, досягається шляхом злиття їх із клітками мієломної пухлини мишей і застосування системи метаболічної селекції для знищення негібридних пухлинних кліток. Більшість кліток міеломи, використовуваних для зазначеної мети, позбавлені ферменту Г/ГФРТ (гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансфераза). Гібридами, що виходять у результаті злиття із цими клітками, селекціонуються в так званій ГАТ (гіпоксантин-аміноптерин-тимидин) селективній системі. Нормальні соматичні клітки можуть використовувати два шляхи синтезу пуринів і піримідинів: основний шлях, що передбачає синтез *de novo* з амінокислот і вуглеводних попередників, і резервний шлях, при якому синтез нуклеотидів здійснюється з гіпоксантина (пурини) або з дезокситимідина (піримідини). Якщо основний шлях з якоїсь причини блокується, наприклад таким антагоністом фолієвої кислоти, як аміноптерин, то в нормальних клітинах нуклеотидів може використовуватися резервний шлях. У зазначені шляхи синтезу включаються, відповідно фермент Г/ГФРТ і фермент ТК (тимідинкіназа). А поскільки використовувані клітки міеломи звичайно селекціоновані у відношенні дефіциту ферменту Г/ГФР1, то вони будуть рости тільки в тому випадку, якщо шлях синтезу *de novo* є синтактним; у присутності аміноптерина вони не можуть вижити. Гібридні лимфобластні клітки міеломи, що виходять у результаті злиття між імунними лімфобластоїдними клітками й дефіцитними по змісту Г/ГФРТ клітками міеломи (гібридами), і самі лімфобластоїдні клітки, що виживають у присутності аміноптерина, забезпечують наявність гіпоксантина й тимідина для резервного шляху синтезу.

Тільки гібридні безсмертні клітки дійсно здатні проліферувати і утворювати безупинно зростаючі клітинні лінії.

Клітки міеломи, дефіцитні по ферменті Г/ГФРТ, можна от селекціонувати із клітинних популяцій, які у зазначеного дефіциту за допомогою культивування останніх у присутності метаболічних отрут, таких як 8-азагуанін, включаємих у ДНК ферментом Г/ГФРТ і отруйні клітки, в яких дефіцит цього ферменту не проявляється, незважаючи на те що для генерації лімфоцитних гібридом найбільше широко застосовується ГАТ — система селекції. Для селекції

безсмертних гібридних кліток також можна використовувати ряд інших методів: виховання стійкості, необоротне біохімічне інгібування й оборотне біосинтетичне інгібування. Огляд цих методів зроблений Клементсом.

Всі клітки міеломи, що застосовувалися синтезували й (або) виділяли ланцюжка *Ig*. Поступово вони були замінені сублініями, які не продуціювали небажаних важких і легених ланцюжків. Гібридами, сконструйовані з використанням таких ліній кліток міеломи, будуть продуціювати тільки ланцюжки імуноглобуліну, що відбуваються від лімфобластоїдні батьківські клітки, і тому повинні мати переваги перед лініями звичайних продуцентів, у тому числі й після того, як стали доступними лінії з гарної продуктивністю.

Іншим важливим критерієм при ухваленні рішення про вибір, клітинну лінію міеломи є стабільність образуючих гібридом, що почасти залежить від вибору клітинної лінії. У цей час для продукування лімфоцитних гібридом застосовуються в основному три види ліній кліток міеломи: мишей, пацюків і людину. Якщо немає якихось специфічних причин проти цього, то застосовувати лінії кліток міеломи повинні бути того ж виду, що й піддаються імунізації тварин, тому що при цьому у тварин під час генерації гібридом забезпечується розвиток пухлин.

Часто для генерування гібридом застосовується велика кількість ліній кліток. Деякі їхні властивості показані в таблиці 1. Винятково важливо, щоб під час злиття клітки міеломи були в логарифмічній фазі росту.

Найпоширенішим джерелом при злитті активних лімфобластоїдних кліток від мишей або пацюків безперечно є селезінка цих тварин після імунізації. Однак для цієї мети також можуть використовуватися регіональні лімфатичні вузли, периферична кров, кістковий мозок, а також плями *Peyer's* (Перса). Якщо бажано мати гібридами, продуцируючі моноклональні антитіла певних класів імуноглобулінів, то більшу роль можуть грати як режим імунізації, так і джерело лімфобластоїдних кліток. Більшість моноклональних антитіл, що виділяються від злиття із клітками селезінки, ставляться до підкласів *JgG* і *IgM*, хоча в дуже рідких випадках зареєстроване отримання таким же шляхом гібридом, виділених моноклональними антитілами підкласу *IgA*. Було продемонстровано, що продуцируючі *IgA* гібридами більш легко виділяються від злиттів з лімфоїдними тканинами кишечника.

Описані також моноклональні антитіла підкласу *IgE*.

6.4. Гібридизація

Спонтанне злиття диференційованих еукаріотичних кліток у природі є незвичайним, хоча має місце при заплідненні, розвитку м'язів і утворенні гігантських кліток. Злиття кліток ссавців *in vitro* може бути індуковано багатьма вірусами, хімічними речовинами, електричними полями або імунізуючими антигенами. Механізми, що діють при злитті кліток, індукованому вірусами, вивчені досить детально, особливо для вірусів Сендай і Лісу Семлики. Після того як для одержання більших кількостей зростаючих гібридів соматичних кліток був застосований поліетиленгліколь (ПЕГ), він став агентом, що обирається для генерації гібридних кліток, включаючи лімфоцитні гібридами, оскільки це з'єднання відносно нетоксичне й досить ефективне. Точний механізм, за допомогою якого ПЕГ індукується злиття кліток, поки ще пізнаний не повністю. Однак представляється, що він включає зміни у водній фазі, що прилягає до поверхонь мембран. Виявилося, що для успішного злиття вирішальне значення мають оптимальна концентрація, молекулярна маса ПЕГ і час експонування. Оптимальна концентрація ПЕГ перебуває в діапазоні 30- 50% (маса/обсяг). Часто додають 5-10% (маса/обсяг) диметилсульфоксида (ДМСО), що підвищує ефективність злиття й робить на клітки захисна дія. Стандартний режим злиття, традиційно застосовуваний у лабораторії авторів цієї глави, був розроблений на основі декількох опублікованих методів.

Невід'ємною проблемою в процесах злиття, здійснюваних за участю ПЕГ, є те, що обробка кліток ПЕГ приводить до неселективного злиття однієї клітки з іншої. Отже, кінцевий зміст зростаючих гібридів, що виділяють антитіла, специфічні для імунізуючого антигену, виявляється відносно низьким. Теоретично ПЕГ повинен бути здатний селективно приєднувати клітки мієломи до антигенреактивним лімфоцелам за допомогою розміщення антигену між двома клітками в якості сполучної ліганди. Коли клітки мієломи, покриті антигеном, інкубуються із клітками селезінки імунізованих мишей, злиття буває спонтанним. Така методика розроблена для одержання антитіл до полісахаридних антигенів і до неантигенних або дуже слабких антигенних лігандів. Електрозлиття застосовувалося для різних типів кліток, включаючи лімфоцити, призначені для продукування моноклональних антитіл. При такому методі клітки експонуються до впливу змінного електричного поля низької інтенсивності й піддаються «дieleктрофорезу». У такому випадку в клітках генеруються диполі й сили притягання між диполями орієнтують клітки. Такі орієнтовані клітки піддаються короткому впливу електричного імпульсу високої напруги, що викликає появу мікроскопічних пор у мембранах кліток. Ці пори звичайно бувають, у місцях, де мембрани стикалися з електричними «ударами». Через, що розширюються пори вміст кліток змішується між собою, і в остаточному підсумку клітки фізично зливаються один з одним.

До переваг описаного процесу в порівнянні з методами хімічного й біологічного злиття варто віднести високу ефективність (до 100% кліток, що злилися) і «м'якість», що виражається у високому відсотку життєздатних гібридів.

Можливості даного методу як альтернативи методу злиття з використанням ПЕГ поки ще не оцінені повністю.

6.5. Культивування гібридом

Після злиття клітки суспендирують у середовищі НАТ, використовуюваної для гібридизованих кліток. Деякі дослідники давали можливість кліткам рости в середовищі без аміноптерина короткий час або збільшували концентрацію аміноптерина поступово. Для вирощування гібридом *in vitro* використовують різні живильні середовища такі, як середовище Дульбекко, модифіковане середовище Голка (DMEM), що має підвищений вміст глюкози (4,5 г/л), середовища **RPMI1640** і **NCTC99**. З метою полегшення росту гібридом і продукування моноклональних антитіл дослідники часто застосовують різні компоненти, що доповнюють живильні, середовища в які культивуються тканини (див. додаток). Звичайно спочатку культури підтримуються в інкубаторі у зволоженій атмосфері при вмісті в повітрі 5—10% O_2 при 37°C. Клітки мієломи, дефіцитні по Г/ГФРТ, підтримуються в посудинах для культивування тканин у суспензійній культурі із щільністю в діапазоні $3 \cdot 10^5$ і $3 \cdot 10^6$ кліток/мол у присутності 100 мкМ аза-гуаніну для того, щоб запобігти появі ревертантів. Звичайне середовище культивування, застосовуване на початкових стадіях розмноження гібридом, містить інактивовану (30 хв при 56°C), очищену сироватку плода теляти, що підтримує ріст гібридів. Для забезпечення росту кліток мієломи й гібридів на пізніх стадіях культивування можна використовувати менш дорогу сироватку теляти.

Останнім часом були розроблені кілька прописів безсировоточних середовищ. Такі середовища мають безперечна перевага, особливо у випадку великомаштабного виробництва *in vitro* моноклональних антитіл, у тім відношенні, що їх можна використовувати в очищеному виді. Клонування гібридних клітин варто починати настільки рано, наскільки це можливо, використовуючи при цьому обмежуючі розведення або напівтверді середовища. Для реалізації методу обмежуючих розведень безпосередньо відразу після злиття клітинна суспензія засівається в рідке середовище в чашки для мікрокультури або в так звані клонуючі чашки. Для того щоб дати можливість одиночній клітці гібридомної культури частини, необхідно використовувати або живильні клітки, або кондиційовані середовища. Передбачається, що живильні клітки роблять неспецифічне й ростстимулюючий вплив на гібридами. Для цієї мети найчастіше використовують мишачі або щурячі тимоцити, покривитися макрофаги або клітки, що не злилися, селезінки. Наявність макрофагів може приносити додаткові вигоди, оскільки вони сприяють підтримці культур без контамінантів. Однієї з головних «проблем, з якої доводиться зіштовхуватися в

багатьох лабораторіях, що традиційно займаються виробництвом моноклональних антитіл, є контамінація мікоплазмами, тому що вони мають селективне споживання попередників нуклеїнових кислот (пуринів і піримидинів) і тому добре ростуть у середовищах гібридомних культур. Якщо встановлено, що даної культури контаміновані, то їх необхідно якомога швидше ліквідувати, тому що їхній потенціал загрожує іншим культурам. Методи виявлення мікоплазм у культурах кліток.

Коштовні культури гібридом з метою запобігання від контамінації мікоплазмами можна обробити специфічною антисивороткою, антибіотиками або шляхом пасивування їх через тварин, що розмножуються. Однак застосування антибіотиків може приводити до наведення в мікоплазм стійкості до антибіотиків, а деякі антибіотики, такі, як гентаміцин, можуть індифікувати ушкодження хромосом у мишачих клітках.

Ідентифікація клонів, що виділяють потрібні антитіла, повинна вироблятися якомога раніше для того, щоб потім зосередити зусилля саме на цих цільових клітках. Тому треба мати у своєму розпорядженні чутливі й швидкі методи скринінгу.

6.6. Застосування моноклональних антитіл

У всіх галузях науки, де застосовуються звичайні поліклональні антисироватки, рано або пізно вони будуть замінені моноклональними антитілами або строго певними змісями моноклональних антитільцями моноклональних антитіл. Зведені дані про властивості моноклональних антитіл у порівнянні із властивостями загальноприйнятих антисироваток наведені в таблиці 3. Для подолання деяких теоретичних і практичних недоліків в використанні моноклональних антитіл може виявитися необхідним при змішуванні їхніх сумішей.

Оскільки за перші 10 років свого існування технологія моноклональних антитіл поширилася на більшість областей біологічних досліджень і клінічної медицини, то практично неможливо перелічити всі випадки її застосування. Нижче розглядаються приклади тих областей застосування технології моноклональних антитіл, у яких вона довершила свої переваги, у цьому розділі також висвітлюються окремі перспективи по цій проблемі.

Технологія гібридом виразно перетворила всю область імунології. Майже всі імунологічні лабораторії зараз у тій або іншій формі використовують моноклональні антитіла: або при ідентифікації специфічних хімічних угруповань, або для забезпечення очищення молекул важливих хімічних сполук, виділених клітками й накопичуються в них, або для застосування в складних біологічних сумішах. Генерація й застосування моноклональних антитіл проти людських і мишачих клітинних поверхневих антигенів лімфоцитів сприяли розгортанню досліджень функціональних аспектів різних субпопуляцій на основі існування різної диференціації антигенів. Такі антитіла вже істотно полегшили пізнання процесів імунорегуляції і виявлення аномальності в імунорегуляції в людей. Більше того, вони надали допомогу в моніторингу імунорегуляційної терапії й застосовуються в якості терапевтичних імунорегулюючих агентів. Багато груп дослідників вивчали перспективи застосування моноклональних антитіл проти лімфоцитів людини в процесах

Таблиця 6.1 Властивості моноклональних антитіл у порівнянні із властивості поліклональних

антисироваток		
Показники	Поліклональні сироватки	Моноклональні антитіла
Грудомісткість зберігання	Невелика	Значна
Вміст специфічного Ig	0,1—1,0 мг/мол	1,0—10 мг/мол (асцит 1-0,025 мг/мл осадова рідина)
Інші Ig	10 мг/мол	Змінна кількість
(Під)клас специфічного Ig	Суміш	Звичайно один
Специфічність	Низька (може бути підвищена за допомогою адсорбції)	Найвища від можливих (для деяких застосувань навіть занадто висока)
Відтворюваність специфічності й засобу	Варіює від партії до партії	Абсолютна
Гомогенність	Гетерогенний продукт	Гомогенний продукт
Доступність	Обмежена	Практично не обмежена
Реагує з	У принципі з усіма антигенними детермінантами в імунізуючому антигені	Одною антигенною детермінантою
Побічні реакції (з іншими антигенами)	С антигенами, що породжують загальні детермінанти	Відсутні повністю якщо реагують із загальними детермінантами
Застосовність у серологічних пробах	Гарна	Може не працювати

іммуноподавлення й при трансплантаціях кісткового мозку. Моноклональні антитіла знаходять застосування в різних серологічних, структурних і функціональних дослідженнях, проведених у зв'язку з вивченням основного комплексу антигенів гістосумісності (ГКГС). Використання цих антитіл дозволяє визначити топографію розташування різних детермінант на зазначених антигенах у зв'язку з виконанням ними різних функцій.

Іншим прикладом застосування гібридомної технології може служити використання моноклональних антитіл для роботи в області інфекційних агентів і викликуваних ними захворювань. Піонерами в цій області були Герхард і Уэбстер, що одержали різноманітні моноклональні антитіла проти гемаглютиніна вірусу грипу. Вони змогли репродукувати антигенний дрейф *in vitro* шляхом розмноження вірусу грипу в присутності відібраних нейтралізуючих моноклональних антитіл і продемонстрували наявність у молекулі гемаглютиніна вірусу вентиляцій ділянок. Застосовувши моноклональні антитіла, дослідники показали, що у вірусі сказу, що антиген дуже стабільний, можна розрізнити трохи географічно обмежених підтипів. Це дослідження має важливе значення для вироблення вакцинної стратегії й вибору штамів для вакцин проти сказу. Аналогічні дослідження були проведені також з багатьма іншими

вірусами. Ми продемонстрували, що моноклональні антитіла можна використовувати для внутріпорової диференціації поліовірусних вакцин і ізолятів вірусу грипу. Це було зроблено за допомогою комп'ютера при використанні теоретично розроблених програм, що враховують подібність структур вірусів.

Крім проведення таких аналізів структури й епідеміології інфекційних агентів, у тому числі вірусів, бактерій і паразитів, моноклональні антитіла можна буде використовувати в діагностиці, терапії й запобіганні інфекційних захворювань.

Їхня роль в одержанні вакцин не обмежиться аналізом антигенних структур; вони знайдуть також застосування в очищенні імуногенних препаратів методами хроматографії, селекції клонів рекомбінантної ДНК, продуцируючи потрібні антигенні структури, а також при оцінці й селекції синтетичних пептидів, що підлягають використанню в якості імуногенів при вакцинації. З іншого боку, моноклональні антитіла будуть застосовуватися з метою контролю вакцин по показниках ідентичності й ефективності. До останнього часу при контролі вакцин на відсутність сторонніх агентів застосовувалися звичайні антисироватки. Вони призначалися для нейтралізації живого компонента вакцин перед тим, як піддати відповідні зразки випробуванням у культурах і (або) на тварин. Звичайно ж, у силу своєї виняткової специфічності моноклональні антитіла будуть мати в цих випадках незаперечні переваги, тому що дозволять нейтралізувати або інгібувати невідомі агенти, у той час як у звичайних антисироватках можуть бути присутнім антитіла проти таких агентів.

Зовсім нові можливості застосування моноклональних антитіл відкриваються в найближчому майбутньому в області створення вакцин, тому що тоді стане реальним наведення специфічного імунітету за допомогою антидіотипових антитіл. Недавно було показано, що мишею можна імунізувати проти інфікування *Trypanosoma rhodesiense* шляхом введення їм поліклональних аллогенних антидіотипових антитіл, що викликають реакцію проти ідіотипів захисних моноклональних антитіл. Застосування поліклональних гетерогенозних або аллогенних антидіотипових антитіл має кілька негативних сторін. Насамперед дуже важко забезпечити виробництво препаратів поліклональних антидіотипових антитіл високої сталості й тієї ж самої ідентичності. Лише невелика частка цих антидіотипових антитіл буде індукувати появу молекул, що породжують ідіотип, що буде зв'язувати антиген. Тому моноклональні антидіотипові антитіла, що володіють зв'язаним епітопом, будуть являти собою ідеальний антидіотипний вакцинуючий матеріал.

Ми показали, що застосування моноклональних антидіотипних антитіл при вакцинації мишею забезпечує індукціювання нейтралізуючих антитіл проти поліовірусу II типу. Отже, ці моноклональні антидіотипові антитіла в процесах індукції противірусних нейтралізуючих антитіл замінюють антигени.

Іншою областю, у якій застосування моноклональних антитіл принесло великий успіх, є дослідження багатьох аспектів захворювань раком. І тут головне місце займає одержання моноклональних антитіл, за допомогою яких можна розрізняти нормальні й злоякісні клітки; були вишукані поверхневі антигени, які чітко й недвозначно виявляють злоякісні клітки. Хоча пошуки детермінант таких антигенів, які специфічні для пухлинних кліток, ще тривають, більшість із детермінант, які дійсно виявилися специфічними для зазначених кліток, були виявлені в ембріональних («онкоантигенні зародка») і деяких нормальних кліток. Однак їх можна використовувати для виявлення пухлинних кліток лише за певних умов. Інший підхід полягає в застосуванні моноклональних антитіл до продуктів, вироблюваних диференційованими клітками певної тканини, з метою визначення функціонального стану кліток у пухлині. Прикладом може служити застосування моноклональних антитіл до мембран жирових глобул молочної залози людини. Крім застосування моноклональних антитіл для діагностики злоякісності тих або інших тканин, вони, будучи кон'югованими з радіоактивними агентами, можуть дозволити одержати відображення картини пухлин і метастаз. Можливості імунотерапії людей за допомогою моноклональних антитіл, спрямованої проти пухлинних антигенів, у цей час широко вивчаються. Імовірно, кращою ілюстрацією такого підходу зараз можна вважати застосування ідіотипу на неопластичних лімфоцитах у як джерелах пухлинних антигенів. У таких випадках виключення

всіх кліток, що породжують ці антигени, за допомогою антиидіотипних моноклональних антитіл буде усувати пухлину або зменшувати її специфічним шляхом. Поверхня *Ig* може служити прототипом пухлинного антигену, оскільки є багато даних про його структуру, порядок комплектування антигенного складу, позаклітинних аналогів, метаболізм і реакції з'єднання з антитілами. У багатьох дослідженнях, спрямованих на застосування моноклональних антитіл для боротьби з пухлинними антигенами, використовувався прийом приєднання до антитіл цитотоксичних агентів. Зокрема, до антитіл були приєднані рицин і дифтерійний токсин, що дозволило визначити, чи можна націлювати селективно ці агенти на пухлинні клітки (ідея «чарівної кулі»). Одна із проблем проведення подібних досліджень полягає в тому, що при цьому людина контактує з мишачими або щурячими моноклональними антитілами. Для діагностичних і терапевтичних випробувань *in vivo* на людях варто віддавати перевагу застосуванню моноклональних антитіл людини, тому що в цьому слу чаї багаторазова обробка людей не буде приводити до алергійних реакцій.

Зараз особливо підкреслюється велике практичне значення антидіотипових антитіл, генеріруємих у ході злоякісного захворювання або в результаті обробки моноклональними антитілами. Саме такі екзогенно керовані антитіла можуть стати настільки ж важливим засобом запобігання й лікування злоякісних пухлин, яким вони виявилися при запобіганні інфекційних захворювань. Було показано, що інокуляція людей мишачими моноклональними антитілами, спрямована проти певних ракових антигенів, приводить до вироблення в деяких пацієнтів антидіотипових антитіл. Такі пацієнти клінічно видужують і мають тривалу ремісію. Імовірна присутність внутрішнього відображення ракового антигену на іммуноглобуліновій молекулі людини може змінювати умови, при яких імунна система впливає на пухлинний антиген і дає можливість використовувати нові підходи до керування ростом пухлин.

Контрольні запитання:

1. яким чином можна оцінити мономерні форми глікопротеїнів мікроорганізмів або вірусів відносно імуногенності?
2. Які умови є дуже важливими під час злиття клітки мієломи?
3. Охарактеризуйте механізми, що діють при злитті кліток, індукованому вірусами?
4. При яких умовах підтримується ріст гібридів?

ТЕМА: 7 Фракціонування вірусів і готування субодиничних вакцин

7.1 Характеристика вакцин

Звичайна вірусна вакцина складається в принципі із суспензії атенуйованих або інактивованих вірусних часток, уведених у рецептуру в концентрації, що буде викликати в організмі реципієнта потрібна імунна відповідь. Вакцину можна консервувати заморожуванням - висушуванням. Для посилення потенції у вакцину вводяться ад'юванти. Вона повинна бути ретельно проконтрольована на відсутність контамінуючих біологічних агентів. При правильному підборі рецептури вакцина безпечна й ефективна. Однак, незважаючи на строге дотримання правил виробництва, вакцина завжди залишається з біологічної точки зору дуже нечистим препаратом, лише вкрай незначна частина цього препарату служить активним інгредієнтом.

Важливе розходження між вакцинами з живих атенуйованих і інактивованих вірусів полягає в кількості вірусного матеріалу, що входить в імунізуючу дозу. Взагалі, живі атенуйованні вакцини вимагають лише наявності в дозі такої кількості вірусу, що здатне викликати в реципієнта субклінічну інфекцію. Такі вакцини розраховані на наступне розмноження вірусу, що втримується в дозі яке забезпечить необхідні імуногенні стимули. На противагу цьому інактивуванню вакцини повинні містити в дозі достатню кількість вірусного матеріалу, щоб стимулювати імунну систему організму хазяїна лише при такій умові реципієнт зможе одержати захист від можливого інфікування. Якщо в дозі не буде втримуватися досить антигенної маси, то вакцина не зможе бути ефективною. Головна проблема технології виробництва інактивованих вакцин і полягає в тому, щоб у дозу було включено достатня кількість вірусного антигену. Якщо для дози живої атенуйованої вакцини досить мати титр вірусу близько 10^3 для ефективного прояву інактивованої вакцини необхідно використовувати її еквівалент, оцінюваний титром 10^7 — 10^8 ТСД₅₀. Отже, концентрація вірусу в дозі інактивованої вакцини повинна перевищувати таку в дозі живий атенуйованої вакцини в 10-100 000 разів. Знайти клітинну систему, у якій вакцинний вірус міг би розмножуватися до досить високих титрів, придатних для безпосереднього готування інактивованої вакцини, не завжди можливо. У таких випадках доводиться прибїгати до техніки концентрування, що дозволяє одержувати препарати з достатніми титрами вірусу. Як наслідок цього кінцева форма вакцини буде містити не тільки більші кількості різних вірусних білків, але також і білки, сконцентровані із субстрату, на якому вірус розмножувався.

Це означає, що інактивованні вакцини, як правило, містять значну кількість сторонніх білків, які не вносять позитивного внеску, очікуваного від застосування вакцин, але можуть викликати в пацієнтів небажані побічні ефекти. Кількість небажаного білка, що залишається в препараті від субстрату, можна звести до мінімуму завдяки застосуванню в ході виробництва різних операцій очищення. Але якщо як активний компонент вакцини використовується цільний вірус, то в кожній дозі вакцини завжди буде перебувати надлишок вірусного білка.

Концепцію біохімічної чистої вакцини можна реалізувати, якщо ідентифікувати ті компоненти вірусної частки, які стимулюють в організмі реципієнта утворення нейтралізуючих антитіл. Одержання лише таких компонентів може розцінюватися як наробіток очищених антигенних препаратів. Вони будуть викликати утворення високоспецифічного імунітету без яких-небудь побічних ефектів, обумовлених наявністю у звичайних препаратах із цільних вірусів вірусних нуклеопroteїнів або залишків субстратних білків.

Справжня глава описує прогрес, що був досягнутий : у розробці методів одержання очищених препаратів біологічно активних вірусних субодиниць, а також у застосуванні цих методів з метою вдосконалення інактивованих вірусних вакцин.

7.2. Методи фракціонування

7.2.1. Солюбілізація

Чутливість багатьох вірусів до детергентів і розчинників ліпідів відома давно. Багато вірусів втрачають інфекційність при обробці одним із зазначених агентів або втрачають здатність стимулювати утворення нейтралізуючих антитіл. Електронна мікроскопія показує, що чутливі віруси внаслідок зазначеної обробки руйнуються.

На практиці така техніка широко застосовується як засіб дослідження морфології й структури вірусів. Чутливість вірусів до розчинників ліпідів служить характеристикою, по якій виробляється їхня класифікація; вона дозволяє виявити віруси із зовнішньої ліпопротеїновою оболонкою. Саме в групі цих вірусів був досягнутий найбільший успіх у виділенні субодиноць. Було продемонстровано, що суміш діетилового ефіру й препарату Твін здатний руйнувати ліпідну мембрану віріона грипу. Це спостереження відкрило більшу серію досліджень із багатьма вірусами й агентами.

Органічні розчинники. Описано застосування діетилового ефіру із препаратом Твін і без нього, а також три(п-бутив) фосфату з метою руйнування вірусних часток і готування субодиночних препаратів вірусів групи і сказу. З меншим успіхом використовувалися хлороформ і підкислений метанол для одержання субодиночної вакцини проти інфекційного бичачого рінотрахеїта (вакцина герпес-вірусу). Однак у цілому органічні розчинники не вважаються кращим засобом для готування субодиночних препаратів.

Детергенти. Увага до цих агентів було притягнуто тим, що обробка вакцини грипу дезоксихолатом натрію або додецилсульфатом натрію знижує її пірогенність. Однак твердий вплив таких агентів приводило до руйнування антигенності одержуваних субодиноць. Тому їхнє застосування при готуванні вакцин не одержало визнання.

Селективна солюбілізація глікопротеїна з вірусу парагриппу була відзначена для катіонного детергенту - цетилтриметиламонія броміду. Значно ширше використовуються для солюбілізації субодиноць тенон - іоногенні детергенти, такі, як Тритон X-100 і Нонидет Р 40. Ці агенти по своїй дії є порівняно м'якими, не ушкоджують субодиноць. Тому останні зберігають свою антигенність і їх можна використовувати для готування вакцин.

Для солюбілізації глікопротеїнових субодиноць із вірусу парагриппу успішно був застосований незвичайний детергент - амфотерний детергент Емпиген ВВ.

Ферменти. Для одержання субодиноць знайшли застосування протеолітичні ферменти. Є опис застосування бромелаїна для виділення гемагглютиніна з вірусу грипу [5]. При цьому був отриманий продукт, вільний від нейрамінідази, що звичайно завжди є присутнім, якщо для обробки застосовуються детергенти.

Трипсин здатний видалити з вірусу везикулярного стоматиту поверхневі вирости, а протеаза, отримана із *Streptomyces fradiae*, - гемагглютинін і нейрамінідазу з вірусу грипу.

Інші агенти. Субодиночні антигени були виділені безпосередньо з інфікованих кліток, прикріплених до ростової поверхні, шляхом обробки їх 4 М сечовиною. Субодиночний антиген 125 вірусу ящура успішно був отриманий у досвідах методом діалізу проти цитратного буфера при рН 4,5.

У таблиці 9.1 наведені дані про солюбілізуючих агентів, застосовуваних звичайно при одержанні вірусних субодиноць.

Сепарація

Обробка вірусної суспензії відповідної солюбілізуючим агентом приведе до руйнування вірусних часток і виходу з них необхідних субодиноць. У результаті виходить суміш вірусних нуклеоїдів і поверхневих субодиноць. Одержати чисті субодиночні препарати можна тільки після поділу суміші. Хоча деякі автори вивчали властивостям субодиночних препаратів, отриманих без проведення стадії сепарації, проте в практичному саме так, як зазначено вище, особливо якщо ціль складається в одержанні очищених нереактогенних вакцин.

Одним з найпростіших методів відділення субодиноць від небажаних залишків вірусів є адсорбовані суміші гідроокисом алюмінію. Так, коли для успішної експлуатації вакцин у них в

остаточному підсумку вводяться ад'юванти, то застосування гідроокису алюмінію як засобу виділення субодиноць має явні переваги. Гель гідроокису додається до суміші субодиноць при належному значенні рН, отримана система піддається центрифугуванню. Надосадову рідину викидають, а конгломерати гідроокису алюмінію з адсорбованими субодиноцями ресуспендирують у потрібному розріджувачі. Недоліком даного методу є те, що субодиноці перебувають не у вільному виді. Це дуже утрудняє точний кількісний аналіз зразків, і при спробі стандартизувати продукт з'являється ряд проблем.

У препаративному масштабі знайшов застосування метод, в основі якого лежить використання хроматографічних колонок. Зокрема, за допомогою колонок з Сефадексом А50 був досягнутий поділ гексонів і волокнистих субодиноць аденовірусу 5-го типу. Вірус грипу, адсорбований на колонку фосфату кальцію й потім елюйований за допомогою три (л-бутил) фосфату, давав у результаті чистий препарат субодиноць, а нуклеоїди віріонів залишалися на колонку.

Набагато ширше застосовується метод виділення субодиноць за допомогою центрифугування в градієнті щільності, звичайно в градієнті сахарози. Достоїнством методу є те, що він застосовний як у препаративних, так і в великомасштабних операціях. Субодиноці, як правило, мають меншу щільність, чим вірусні нуклеоїди, від яких вони повинні бути відділені. Тому, коли солюбілізована суміш центрифугується через градієнт щільності сахарози, субодиноці й нуклеоїди будуть утворювати чіткі іпланти з хорошо розділюючими слоями, які можна зібрати як самостійні фракції.

Техніка поділу в градієнті щільності була вдосконалена стосовно до великомасштабного виробництва субодиночної грипозної вакцини. Неіоногенний детергент Тритон N101, включений у сахарозний градієнт, яким заповнюється ротор зональної центрифуги, під впливом центрифугування утворює у градієнті шар мицелл детергенту. Коли через цей градієнт центрифугуванню піддаються частки вірусу грипу, то по досягненні шару детергенту вони руйнуються. Поверхневі глікопротеїни, гемагглютинін і нейрамінідаза відділяються від вірусних нуклеоїдів і утворюють у градієнті шар, що примикає до детергенту. Вірусні нуклеоїди переходять у більше щільну зону градієнта. У такий спосіб досягається ефективний поділ. Такий метод дозволяє здійснити солюбілізацію й сепарацію субодиноць за одну операцію, а відбір необхідних фракцій із градієнта забезпечує одержання суспензій субодиноць, практично зовсім вільних від вірусних нуклеоїдів.

7.2.3. Очищення

З описаних вище методів відділення вірусних субодиноць від вірусних нуклеоїдів особливої уваги заслуговують адсорбція й елюювання, які не пов'язані із застосованому солюбілізуючих агентів. Наявність у субодиночних препаратах солюбілізуючих агентів неприпустимо, але якщо вони потрапили в препарати на стадії сепарації, те варто вжити заходів до їхнього видалення. Одним з варіантів такої обробки може бути застосування «Біобусинок» (Bio-Beads SM2), виготовлених з полімеру дівінілбензола зі стирилом. Такий полімер має спорідненість із неіоногенними детергентами, такими, як Тритон. Детергент із оброблюваної суміші вибірково адсорбується полімером, а надосадову рідину, вільну від детергенту, можна декантувати і використовувати як напівфабрикат цільового продукту.

Тритон можна також видалити, використавши позитивні якості феномена «температури помутніння». Фракції, зібрані із градієнта щільності при сепарації суміші, у яких утримуються субодиноці й детергент Тритон, поєднуються й до них додається 2 М фосфатний буфер при рН 7,0 для того, щоб підвищити молярність суміші до 0,5 М. У цих умовах крапка помутніння детергенту буде перевершена при кімнатній температурі. Після відстоювання протягом 18 год відбувається поділ фаз: детергент флотується у верхній частині суміші, а субодиноці залишаються в нижньому шарі, з якого вони витягають уже вільними від детергенту.

7.3. Застосування

7.3.1. Протигрипозна вакцина

Для руйнування вірусу грипу запропоновано багато методів. Найбільш важливі з них згадані вище. Однак ефективно руйнування вірусу, якщо навіть воно проводиться із застосуванням кращої техніки сепарації й очищення, ще необов'язково гарантує одержання ефективної вакцини. Важливо при цьому створити умови, у яких виділювані з вірусу й що збираються субодиночці збережуть антигенність.

Обробка органічними розчинниками, такими, як діетиловий ефір, приводить до руйнування ліпідної мембрани віріона й до виходу з її нуклеопротеїнів. «Шматочки» ліпідної мембрани, що зберігають глікопротеїнові субодиночці її поверхні, утворюють дрібні розетки, які володіють антигенністю й можуть скласти основу вакцини. Такі ферменти, як бромелайн, будуть «розсікати» паличкоподібні субодиночці в крапках їхнього занурення в ліпідну мембрану, залишаючи вірусний нуклеоїд інтактним. Неіоногенні детергенти (наприклад, Тритон N101) звільняють неушкоджені глікопротеїнові субодиночці з основи структури без якого-небудь дроблення. І знову вірусний нуклеоїд залишається інтактним. Очевидно, антигенність субодиночок особливо добре зберігається у випадку застосування останнього із цих трьох методів.

Електронна мікроскопія субодиночочних препаратів, приготуваних з використанням Тритона N101, підтвердила ці припущення. Глікопротеїни, виділені з поверхні віріона грипу, бувають двоякого роду й представлені гемагглютиніном і нейрамінідазою. Обробка детергентом Тритон N101 дозволяє виділити ці субодиночці інтактними. У водних суспензіях вони розпадаються на дрібні специфічні групи. Групи паличок гемагглютиніна будуть прикріплюватися один до одного за допомогою «липких» кінців, які спочатку були занурені в ліпідну мембрану віріона.

Нейрамідазні субодиночці будуть утворювати агрегати, які відрізняються від гемагглютинінових агрегатів і легко розпізнаються по луковичеподібних зовнішніх кінцях структур цього глікопротеїна у вигляді паличок. Ця здатність утворювати агрегати, які не змішуються із субодиночками, що виділяються при обробці бромелайном, виявилася критичною для збереження антигенності, необхідної для вакцинації.

Коли розроблялася субодиночочна грипозна вакцина переслідувалася мета, щоб вона мала таку ж імуногенність, як і звичайна вакцина із цільного вірусу, але була б менш реактогенна. Порівняльні дослідження сучасних вакцин цих видів показали, що поставлена мета досягнута, хоча розходження між вакцинами були виражені не дуже сильно.

Спочатку було визнано необхідним підсилити антигенність субодиночочної грипозної вакцини шляхом її адсорбції на гідроокисі алюмінію. Однак, після того як це було зроблено виявилось, що втрачено деякі достоїнства зниженої реактогенності. Тепер визнано, що ад'ювант гідроокису алюмінію не є необхідним компонентом вакцини. Порівняння адсорбованої субодиночочної вакцини з такою ж, але водною вакциною показало однакову їх імуногенність і навіть більше низьку частоту прояву реакцій для водного субодиночочного препарату.

Очищені субодиночочні грипозні вакцини були першими широкодоступними вакцинами високі біохімічної чистоти.

7.3.2. Віруси парагрипу й кору

Подібно вірусу грипу, параміксовіруси, такі, як віруси кору, сендай й парагрипу, належать до оболочечних вірусів. Вони дозрівають у мембранах інфікованих кліток і виділяють два глікопротеїни, ідентифікуємих як протеїни злиття (*F*), або НА-глікопротеїн (у вірусу парагриппа), або ж НА-глікопротеїн (у вірусу кору). НА-Глікопротеїн проявляє властивості як гемагглютиніна, так і нейрамінідази, у той час як НА-Глікопротеїн складається тільки з гемагглютиніна.

Виділення й очищення цих глікопротеїнових субодиночок були досягнуті за допомогою амфотерно-іоногенного детергенту Емвіджен ВВ, «сирий» препарат був очищений на колонку DEAE Bio-Gel A. Глікопротеїни ідентифікуються в поліакрил амідном гелі додецилсульфата натрію

(ГДС-ПАГЕ) при електрофорезі з використанням методики прокращування вуглеводів. Критичне значення може мати концентрація детергенту Емпіджен ВВ; звичайно вона повинна становити 2%, але для вірусу хвороби Ньюкасла максимальний вихід глікопротеїна доводиться на концентрацію, рівну 0,1%. Метод дуже ефективний, судячи з наявних повідомлень, гемагглютинін і нейрамінідаза відновлюються практично повністю. Отримані препарати субодиноць показали чітко виражену імуногенну здатність. Однак придатність методу для виробництва субодиночних вакцин має потребу в подальшому підтвердженні.

Описане також готування глікопротеїнів вірусу кору, коли як додаткова стадія очищення використовується їхня здатність до відновлення у середині штучних ліпідних мембран при одержанні вірусом з виступаючими глікопротеїновими «зубцями». Первинне руйнування очищеного вірусу досягалося за допомогою препарату **Nonidet P40**; солюбілізовані глікопротеїни були іммобілізовані на колонку з лентин-лектином. Це давало можливість замінити **NonidetP40** іншим агентом — октил-(D-глюкопіранозідом, що може піддаватися повному діалізу. Субодиночний глікопротеїн елюїрувався за допомогою α -метілманнозиду у формі, прийнятної для одержання вірусом шляхом обробки фосфоліпідом. Ця методика була запропонована для аналізу взаємодій вірусу з комплементом, лімфоцитами й клітками [10]. Вона представляє можливість просунутися далі в розумінні хвороб людини, але застосовність її до проблем вакцинопрофілактики поки не досліджена.

Нова форма субодиночних препаратів, описана як імуностимулюючий комплекс, складається з оболочечних глікопротеїнів вірусів парагриппу 3 або кору впливом на них глікозидом **Quil-A**, що представляє собою очищену форму сапоніну. Показано, що імуногенність таких комплексів приблизно в 10 разів більше, ніж у звичайних агрегированих субодиночних глікопротеїнових препаратів; вони також стимулюють утворення антитіл до протеїну злиття (**F**). Електронна мікроскопія показала, що імуностимулюючі комплекси мають характерну кліткоподібну структуру й діаметр, що становить приблизно 12 нм.

7.3.3. Віруси сказу й везикулярного стоматиту

Рабдовіруси, представниками яких є віруси сказу й везикулярного стоматиту, морфологічно характеризуються як нуклеоподібні частки, у яких один кінець закруглений, а інший плоский. Однієї з найбільш характерних особливостей їх, що виявляються за допомогою методики негативного прокращування й електронної мікроскопії, є обволікання й утримання вірусних часток складками (виступами) здвоєної мембрани на всій частці, за винятком плоского кінця. Ці виступи мають довжину близько 7 нм і ідентифікуються як глікопротеїнові утворення [38].

Високоочищені препарати таких поверхневих глікопротеїнів були отримані при обробці вірусу сказу **Nonidet P40**, трифосфатом або бромелаїном і містили невелику кількість оболочечних білків. Остаточне очищення Глікопротеїнових субодиноць досягалася за допомогою ізоелектричного фокусування. Отримані препарати індукіювали утворення нейтралізуючих антитіл у кроликів і захищали мишей при інтрацеребральному введенні від летальної розв'язної дози вірулентного вірусу. Успіх проведеної роботи дозволив зробити дуже важливе припущення про те, що такі препарати варто розглядати як вакцини для людей. Вибір клітинного субстрату для продукування таких вакцин не обмежується тільки тими деякими клітками, які звичайно використовуються у вакцинному виробництві, тому що кінцевий продукт буде найвищою мірою очищений і звільнений від клітинних, а також інших вірусних компонентів.

На відміну від цільних вірусів сказу очищені глікопротеїни не вступають у реакцію гемагглютинації із червоними кров'яними клітками гусака. Обробка цільного вірусу сапоніном приводить до утворення розчинного гемагглютинину вірусу сказу, що зберігає здатність захищати мишей від розв'язної дози вірулентного матеріалу. Обробка сапонинового екстракту дезоксихолатом натрію викликає втрату гемагглютинуючої активності. Це свідчить про те, що гемагглютинація вірусом сказу залежить від цілісності вірусної мембрани.

Аналогічні дослідження з вірусом везикулярного стоматиту показали можливість східчастої деградації вірусної частки [9]. Поверхневі виступи можна видалити обробкою вірусу трипсином.

Така обробка руйнує здатність вірусу індуциувати утворення нейтралізуючих антитіл. Імунізуючий антиген може бути витягнутий з вірусу за допомогою обробки його Твіном, або Nonidet P40 або дезоксихолатом натрію.

Відділення поверхневих субодиноць від вірусних нуклеоїдів можна провести центрифугуванням у градієнті сахарози після обробки детергентом або трипсином. Компоненти, що виходять при цьому, були виявлені в різних крапках градієнта відповідно до застосування засобів обробки. Так, Nonidet P40 дає імунізуючі антигени, що залишаються поблизу верхньої частини градієнта, і вірусний «кістяк», седиментуючий у напрямку дна. Рибонуклеопротеїн, що виділювався під впливом дезоксихолата натрію, седиментує у положення 140S, у той час як компонент, що вивільнився з поверхневих виступів у результаті обробки трипсином, седиментує приблизно в те ж положення, як і неопрацьований вірус.

Очищений Глікопротеїн з вірусу везикулярного стоматиту при введенні у фосфоліпідні пухирці також давав ліпосоми. Відповідний метод передбачає обробку вірусу димирістоїлфосфатидилхолином у холевій кислоті. Такі препарати були використані для того, щоб витягти цитотоксичні Т-лімфоцити проти везикулярного стоматиту, необхідні при проведенні фундаментальних досліджень імунних реакцій на вірусні антигени.

7.3.4 Вірус герпес-симплекс

Із всіх вірусних інфекцій, проти яких вважається необхідним виробництво субодиночних вакцин, вірус герпес-симплекс висуває найбільш вагомі аргументи на користь саме такого підходу. Застосування живої аттенуваної вакцини проти герпес-симплекс підвищило інтерес до здатності вакцинного вірусу утворювати латентні вогнища з можливої наступної реактивації і відповідними ускладненнями. Більше того, особливо це справедливо у відношенні до герпес-симплекс тип 2; було постульовано, що даний вірус в організмі людини може виявитися онкогенним. Про те, що вживаючи аттенувану вакцину герпес-симплекс не є безпечною, була достатня кількість аргументів, щоб призупинити роботи з її вдосконалювання. Крім того, щоб перетворити клітку, вірус не обов'язково повинен бути інфекційним, і тому інтерес до питання про онкогенність живу вакцину може бути розповсюджувати на будь-який вірусний препарат, що містить вірусну ДНК. Отже, розв'язувати проблему безпечної вакцинації проти герпес-симплекс можна тільки шляхом застосування очищеної, вільної від ДНК субодиночної вакцини.

Першими препаратами, що показали здатність захищати мишей від розв'язної дози вірулентного вірусу, були простим, обробленим детергентом препарати інактивованого вірусу герпес-симплекс тип 1, очищені центрифугуванням у градієнті щільності для видалення вірусної ДНК. Такий захист мав місце, незважаючи на те що нейтралізуючі антитіла не виявлялися або перебували на дуже низькому рівні. Аналогічна вакцина типу 1, але приготовлена із застосуванням неіоногенного детергенту, виявилася здатною захищати мишей від вірусу герпес-симплекс тип 2. Субодиночні препарати, отримані в результаті обробки інактивованих вірусних суспензій *Nonidet P40*, при перевірці підтвердили здатність підвищувати кількість нейтралізуючих антитіл в організмі морської свинки. Саме за допомогою вакцини такого типу була продемонстрована можливість обмеження латентної інфекції герпес-симплекс у кроликів. Є також інформація про те, що у вакцинованих субодиночним препаратом кроликів виразки рогики після очної інокуляції вірусу герпес-симплекс знижуються.

Всі наведені приклади підтверджують, що обробка детергентами інактивованими вірусами герпес-симплекс приводить до одержання імуногенних препаратів, які можуть бути вільні від вірусної нуклеїнової кислоти.

У встановлено те, що, як і в, випадку вірусів везикулярного стоматиту й кору, солюбілізовані глікопротеїнові субодиноці, приготовлені з вірусу герпес-симплекс, при обробці його дезоксихолатом можуть включатися в ліпосоми. Такі препарати були використані для індукування цитотоксичних реакцій Т-лімфоцитів в культурах селезінкових макрофагів, отриманих від мишей, зацькованих вірусом. Це було успішно зроблене завдяки наявності в ліпосомах як вірусного антигену, так і антигену Н-2.

Здатність герпес-вірусу *Saimiri* індуциувати вірусний антиген на протоплазменній мембрані інфікованих кліток була розцінена як ще один шлях одержання антигенних препаратів. Обробка інфікованих кліток дитиотрейтолом і формальдегідом приводила до утворення на протоплазменній мембрані пухирців, які містили живий вірус. Ці пухирці володіли антигенністю й виробляли в морських свинок нейтралізуючі антитіла й захищали мишей від інфекції при інтравагінальному введенні розв'язної дози вірусу герпес-симплекс тип 2.

Запатентований метод готування субодиночної вакцини герпесним плекс передбачає екстрагування діючого початку з інфікованих кліток за допомогою 4 М розчини сечовини. Висновок про ефективність препарату, отриманого за допомогою цього методу, ґрунтується на здатності його захищати мишей.

7.3.5 Інші герпес-віруси

Залежно від мети виготовлених вакцин був розроблений метод одержання субодиноць із двох герпес-вірусів ветеринарного профілю. Клітки, інфіковані вірусом хвороби Ауески (свинячий герпес-вірус 1) і оброблені Тритоном X—100 у трисбуфері при рН 9,0, давали субодиноцям, що володіють антигенністю. Такі субодиноці можна було відокремити від вірусної ДНК центрифугуванням. Було показано, що після однократної інокуляції мишей отриманим препаратом у них вироблялися нейтралізуючі антитіла й проявлялися імунні реакції. Обробка приводила до захисту 87% піддослідних тварин від летальної розв'язної дози вірусу.

Подібний метод екстрагування антигенних субодиноць був застосований до культур кліток, інфікованих вірусом інфекційного бичачого ринотрахеїта. При введенні отриманого препарату з повним адьювантом Фрейнда телятам досягався високий рівень виробітку нейтралізуючих антитіл. Дві дози цієї вакцини були достатні для захисту телят при введенні в слизувату носа вірусу інфекційного бичачого ринотрахеїта. Менш прогнозовані результати були отримані у випадку застосування субодиночної вакцини, отриманої з екстракту інфікованих кліток сумішшю подкисленого хлороформу й метанолу. Хоча такий препарат володів високою імуногенністю у відношенні дорослої великої рогатої худоби, він не захищав телят.

7.3.6. Вірус лісу Семліки

Важливість вибору правильної форми агрегування глікопротеїнових субодиноць у препаратах, передбачуваних до використання як вакцини, була продемонстрована на вірусі лісу Семліки. Глікопротеїнові мономерні субодиноці, приготовлені за допомогою обробки вірусу Тритоном X-100, виявилися слабоімуногенними. Якщо детергент видаляли із препарату центрифугуванням у градієнті щільності, то виходив октамер з коефіцієнтом седиментації 29S, що був більше імуногенним. Препарати липосом, приготовлені в результаті діалізу октилглюкозида з використанням яєчного лецитина, були також значно більше імуногенними, чим мономерні субодиноці. Представляється, що ефективність цих препаратів як імуногенів визначається їх мультимерною структурою.

7.3.7 Вірус краснухи

Субодиночні препарати вірусу краснухи при введенні кроликам викликали виробіток у них гуморальних антитіл і утворення опосередкованого клітками імунітету. Для виготовлення вакцини очищений вірус обробляли Nonidet P40 у трис-сольовому буфері з наступним центрифугуванням отриманого препарату в градієнті щільності сахарози й діалізом активних фракцій. Було встановлено, що фракції, що містять оболочечні субодиноці, мають практично таку ж захисну ефективність відносно кроликів, як і жива аттенуйована вакцина.

7.3.8. Аденовірус

Цікавим продовженням описаних прикладів може служити одержання субодиноць із безоболочечних вірусів і використання відповідних препаратів для вакцинації волонтерів. Проведені в цьому плані дослідження показали, що кристалічні субодиночні вакцини, що містять очищені гексони або волокна аденовірусу тип 5, є для людей антигенними й неореактогенними.

Аденовірус тип 5 культивували в клітках бруньок ембріона людини, клітки центрифугували й піддавали обробці фторкарбоном. Розчинні антигени відокремлювали від цільних виріонів центрифугуванням у градієнті щільності хлориду цезію, а гексони й волокна - за допомогою хроматографічних колонок з DEAE-сефадексом А-50. Виділені фракції піддавалися подальшому очищенню шляхом повторної хроматографії, супроводжуванням сепарацією в градієнті щільності сахарози й кристалізацією. Хоча було показано, що отримані волокна субодиноць давали вакцини, більше активні в порівнянні із субодиноцями гексонів, обидва компоненти забезпечували захист від інфікування.

7.4. Переваги субодиночних вакцин

7.4.1. Ефективність

Препаративні процеси, використовувані для готування вірусних субодиноць, ведуться в кілька стадій, на яких відбувається збільшення чистоти кінцевого продукту. Вакцини, отримані таким шляхом, будуть майже повністю складатися зі специфічного імунізуючого білка й тому служать найвищою мірою специфічними антигенами. Варто очікувати, що ця специфічність додасть відповідним вакцинам високу ефективність.

З наведених вище прикладів можна бачити, що субодиночні препарати володіють високої іммуногенністю тільки за умови правильного їхнього готування. Правильне агрегування очищених субодиноць, їх «складання» на липосомах або збереження частини клітинної мембрани - все це поліпшує антигенність швидше за все тому, що при цьому зберігається необхідна просторова конфігурація.

Однак підвищена ефективність обумовлена не тільки властиво субодиночними вакцинами. Підвищена іммуногенність часто досягається шляхом включення в кінцевий продукт адьюванта.

7.4.2 Реактогенність

Поза залежністю від того, виявляться або не виявляться вигоди від переходу до використання субодиночних препаратів як основи вакцин, завжди існують серйозні підстави очікувати зниження рівня небажаних реакцій при застосуванні таких препаратів. Високочищена субодиночна вакцина майже повністю вільна від сторонніх білків клітинної або вірусної природи, і вона не містить нічого такого, що не є необхідним для виробітку тривалої імунологічної відповіді, у результаті чого неспецифічні локальні або системні реакції індуцируватися не будуть. По цій же причині реальна або передбачувана небезпека інокуляції при вакцинації вірусної ДНК із вірусів групи герпес досить просто усувається, якщо використовуються субодиночні препарати. Це підтверджується результатами випробувань безлічі експериментальних партій різних субодиночних вакцин. А що стосується проблеми профілактики інфікування герпес-вірусами, те, імовірно, лише перехід до субодиночних вакцин відкриває реальний шлях до її дозволу.

7.4.3 Стандартист

Високий ступінь очищення, властива субодиночними вакцинами, створює сприятливу можливість для виміру потенції (ефективності) вакцин хімічними, а не біологічними методами. Субодиночні гриппозні вакцини можна стандартизувати по масі білка на дозу, а також бути впевненим, що весь урахований білок, що, буде являти собою специфічний імунізуючий

глікопротеїн. Стандартизація, у свою чергу, буде підвищувати стабільність вакцин, робити їх більше надійними в застосуванні й, отже, дозволить більш об'єктивно прогнозувати результат вакцинопрофілактики. Застосування субодиничних вакцин дозволяє відмовитися від недостатньо точних біологічних підрахунків і оцінок, від постановки тестів на тварин для оцінки ефективності препаратів, а також від непрямих методів виміру імуногенності.

Контрольні запитання:

1. Які вакцини можливо отримувати за допомогою біотехнології тваринних клітин?
2. Розкрийте основи технології вакцин проти раку.
3. Яким чином проводять очищення вакцин?
4. Від чого залежить активність вакцин?

Тема 8. Промислове культивування тваринних клітин

8.1. Живильні середовища і умови культивування

Після витягання кліток з тканини або організму і приміщення їх в культуру культуральне середовище повинне забезпечувати всі зовнішні умови, які клітки мали *in vivo*. Це забезпечує виживання кліток, їх проліферацію і диференціювання. Позаклітинне середовище повинне забезпечувати клітки живильними і гормональними чинниками, тобто володіти всім необхідним для зростання і виживання кліток.

Культури кліток тварин і людини пред'являють певні вимоги до рідкої (живильне середовище), газоподібної (концентрація газів) і твердої (поверхня субстрата) фази. Живильне середовище є розчином певного складу, до якого додаються компоненти невиясненого біологічного походження (добавки плазми, сироватки крові, тканинні екстракти і т.д.). Основу живильних 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. Постійність рН середовища є однією з головних вимог умов культивування.

Для приготування живильних середовищ звичайно використовуються сольові розчини Ерла і Хенкса. Ці розчини, як і фосфатно-сольовий буфер Дульбекко і Фогта використовуються також для зрошування і промивки кліток при пасивуванні культур, виділенні клітинних ліній і інших маніпуляціях з культурами кліток. Іншою важливою умовою культивування є осмотичний тиск. Воно визначається числом мілі осмотично активних частинок (іонів і неіонізованих молекул) розчинених речовин на 1 кг розчинника (осмоляльність) або на 1 літр розчину (осмолярність). У розбавлених водних розчинах ці величини близькі. Осмоляльність розчину (осмоль/кг) = $S \cdot m_i \cdot x_i$, де m_i концентрація i -го розчиненої речовини (міль/кг), x_i кількість частинок, на які дисоціювала його молекула. Наприклад, для розчину Ерла розрахункова величина осмоляльності рівна 310.6 мосмоль/кг, реальна 283. Діапазони рН і осмоляльності, при яких відбувається розмноження кліток, вузькі і варіюють залежно від типу кліток. Наприклад, для клонального зростання диплоїдних фібробластів людини WI38 оптимальні рН=7.30 + 0.15 і осмоляльність 285 + 40 мосмоль/кг, а для фібробластів з ембріона курчати 7.12 + 0.18 і 300 + 20 відповідно. Для підтримки рН в більшості середовищ використовується бікарбонатний буфер: $\text{HCO}_3 = \text{CO}_2 + \text{OH}$, якщо виділяється вуглекислий газ, збільшується концентрація VH . Розчини можуть містити малу кількість бікарбонатного буфера (розчин Хенкса), вони призначені для підтримки рН в щільно закритих судинах. У інших (розчин Ерла) бікарбонату більше, вони використовуються в системах з підвищеним парціальним тиском CO_2 . Якщо культури ведуться поза CO_2 інкубатора, де рН підтримувати важче, необхідні альтернативні буферні системи. Хорошим буфером є HEPES 4-(2-оксиетіл) 1-піперазинетансульфонова кислота. HEPES легко розчинимо у воді, не зв'язує двовалентні катіони, не цитотоксичен до концентрації 0.05 Міль. Застосовується в концентраціях 0.01 0.03 М.

Стандартні середовища для ведення культур тваринних кліток. Середовища Голка MEM (minimal essential medium) і BME (basal medium, Eagle). Частіше використовується MEM. Вона містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін і інозит, виконуючі роль вуглеводного субстрата. MEM використовується тільки з сироваткою, оскільки в ній відсутні біотин, вітамін B_{12} , іони заліза і мікроелементи. Основа розчин Ерла.

Середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Голка). Використовується при культивуванні кліток різних типів, зокрема нетрансформованих кліток і гібридом. Є основою для безсировоточних середовищ. Містить подвійну концентрацію амінокислот, гліцин, серін, піруват, залізо. При використуванні цього середовища необхідний інкубатор з 10% концентрацією CO_2 .

Середовище Іськова IMDM - модифікація середовище Дульбекко. Додані незамінні амінокислоти, біотин, вітамін B₁₂, селеніт натрію. В середу введений NEPES і зменшені концентрації NaCl і NaHCO₃. Середовище безсировоточне, звичайно використовується для культивування лімфоцитів і кровотворних кліток.

Середовище МакКоя 5A і серія середовищ RPMI. Середовище МакКоя 5A розроблене в 1958 році для підтримки клонального зростання кліток карциносаркоми Уолкера 256 у присутності сироватки, а потім вже інших первинних культур і різних клітинних ліній. Звичайно виробляється в модифікації Івката і Грейса (RPMI) і призначена для культивування лейкоцитів у присутності сироватки, часто застосовується і для культивування гібридом. Концентрація CO₂ в атмосфері при культивуванні 5%.

Середовище 199 розроблене в 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерні широкий спектр живильних речовин і невисока їх концентрація. Використовується без добавок, як підтримуюча для первинних кліток, а з сироваткою як ростове середовище для кліток, що швидко розмножуються. Нормальні, зберігаючи специфічні функції клітки на стандартних середовищах не розмножуються (якщо не трансформовані). Для оптимального зростання кліток звичайно додають 5 - 20% фетальної (ембріональної) сироватки.

Сироватка є надзвичайно складною сумішшю дрібних і крупних молекул, здатних як викликати, так і гальмувати зростання кліток. До головних функцій сироватки відносяться: забезпечення гормональними чинниками, стимулюючими зростання кліток і їх функцій; забезпечення чинниками прикріплення і розпластування кліток; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди і т.д. Білки сироватки, що прямо і специфічно беруть участь в стимуляції клітинного розподілу, називаються чинники зростання.

Більшість ростових чинників присутня в сироватці в концентрації декількох нанаграмів на мілілітр і нижче. Деякі з цих чинників специфічні для кліток на певній стадії диференціювання, дія інших не обмежена будь-яким одним типом кліток. Один і той же тип кліток може стимулювати різними ростовими чинниками. Наприклад, фібробласти розмножуються у відповідь на чинник зростання фібробластів, чинник зростання епідермісу, чинник зростання, що синтезується тромбоцитами і соматомедіни. Всі ці речовини є мітогенами (стимулюють мітоз). Іншим важливим чинником зростання практично для всіх типів кліток є гормон інсулін. З інших гормонів найчастіше застосовуються глюкокортикоїди (гідрокортизон, дексаметазон), стероїди (естрадіол, тестостерон, прогестерон) і гормони щитовидної залози (трійодтіронін). Гормони стимулюють або пригнічують зростання залежно від типу кліток і їх густини. Глюкокортикоїди, наприклад, впливають на проліферацію кліток, змінюючи їх чутливість до чинників зростання.

Для перенесення низькомолекулярних чинників (вітамінів, амінокислот, ліпідів і інших) необхідні транспортні білки. В цій ролі виступає альбумін. Транспорт заліза забезпечує трансферрін, а поверхня більшості культивованих кліток містить рецептори для цього білка. До чинників прикріплення і розпластування кліток відносяться колаген і фібронектін, більш спеціалізовані хондронектін (адгезія хондроцитів) і ламінін (адгезія епітеліальних кліток).

Останніми роками розроблені бессировоточні середовища для розмноження кліток. Найчастіше ці середовища вузько спеціалізовані, тобто призначені для певного типу кліток. До базового середовища додається інсулін, трансферрін, гідрокортизон або його аналог дексаметазон і т.д. Бессировоточні середовища мають певні переваги: поліпшення відтворності результатів досвіду унаслідок 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. Культивування кліток у присутності сироватки знаходить і ряд недоліків: для більшості тканин сироватка не є фізіологічною рідиною, з якою вони контактували в початковій тканині, тому, наприклад, сироватка викликає зростання фібробластів, але гальмує зростання епідермальних кератіноцитів; сироватка може бути цитотоксичною, оскільки містить поліаміноксидазу, діючи на поліаміни (спермін, спермідін), що є продуктами секреції швидко проліферуючих кліток (ембріональна сироватка містить відносно багато такого ферменту);

значна варіабельність складу сироваток різних партій; сироватки можуть містити недостатню кількість специфічних ростових чинників, що викликає необхідність додавання їх до культур кліток.

Багато кліток ссавців, перш ніж приступити до проліферації і утворити клітинний моношар, повинне прикріплюватися до субстрату і розпластатися на ньому. У зв'язку з цим встає питання про відповідний матеріал. Як субстрат в даний час використовують декілька матеріалів. Скло краще всього пірекс (алюмоборосилікатне скло), оскільки натрійсилікатне скло може підلужувати середовище і його необхідно кип'ятити в слабкій кислоті перед вживанням. З кожним використанням придатність такого скла падає. Пластик - найчастіше використовують полістирол, полікарбонат, полівінілхлорид, тефлон і інші. Метали - підходить як неіржавіюча сталь, так і титан, оскільки ці речовини хімічно інертні і володіють високим негативним поверхневим зарядом. Клітки прикріплюються за рахунок електростатичних взаємодій, тому поверхня культуральних судин повинна бути змочуваною і негативно зарядженою. Цього можна досягти хімічною обробкою окислючими агентами або фізичними діями (високовольтним розрядом, ультрафіолетовим світлом, бомбардуванням високоенергетичними електронами). Фірми, що виробляють пластиковий посуд, використовують ці методи. Деякі дослідники, не дивлячись на це, віддають перевагу навіть новому посуду перед посадкою кліток обробляти сумішшю концентрованої сірчаної кислоти і біхромата калія (хромова суміш), після чого слідує ретельна промивка. Іноді поверхню судини покривають речовиною, що полегшує прикріплення кліток. Найчастіше для цього використовують колаген і поліамінокислоти.

8.2. Системи культивування кліток

Існує 2 основні системи культивування кліток.

1. Непроточні культури - тип культур, в якому клітки вводять у фіксований об'єм середовища. У міру зростання кліток відбувається використання живильних речовин і накопичення метаболітів, тому середовище повинне періодично мінятися, що приводить до зміни клітинного метаболізму, званого ще і фізіологічним диференціюванням. З часом, в результаті виснаження середовища відбувається припинення проліферації кліток.

Збільшити тривалість життя непроточних культур можна декількома способами:

- переривистий (частина культури замінюється рівним об'ємом свіжого середовища);
- постійний (об'єм культури збільшується з постійною низькою швидкістю, а невеликі порції кліток періодично віддаляються);
- перфузійний (здійснюється постійне надходження свіжого середовища в культуру і одночасне видалення рівного об'єму використаного (безклітинного) середовища. Перфузія може бути відкритою, коли з системи віддаляється все середовище, і закритої, коли середовище, що видаляється, проходить через додаткову судину, де відновлюється її рН і здійснюється аерування, і повертається в культуральну судину.

Всі системи непроточних культур характеризуються накопиченням відходів в тій або іншій формі і непостійністю зовнішніх умов.

2. Проточні культури забезпечують істинні гомеостатичні умови без зміни концентрації живильних речовин і метаболітів, а також числа кліток. Гомеостаз обумовлений постійним входженням середовища в культуру і одночасним видаленням рівного об'єму середовища з клітками. Такі системи придатні для суспензійних культур і моношарових культур на мікроносіях.

Існує 2 крупні напрями в культивуванні тваринних кліток: моношарові культури і суспензійні культури.

Суспензійні культури переважно з погляду збільшення виходу кліток.

Моношарові культури також володіють рядом переваг:

1. Легко провести повну заміну середовища і промити клітки перед додаванням свіжого живильного середовища. Це важливо в тих випадках, коли зростання кліток йде в одних умовах, а напрацювання продукту в інших умовах, наприклад при перенесенні кліток з середовища з

сироваткою в бессывороточне середовище. Можна також повністю видаляти небажані компоненти.

2. Дозволяють забезпечити високу густину кліток.

3. У багатьох кліток експресія необхідного продукту йде ефективніше, якщо клітки прикріплені до субстрату.

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

5. В деяких випадках, наприклад для розповсюдження вірусів, потрібні тісні міжклітинні контакти.

Недоліками моношарових культур є:

- вимоги великого простору;
- зростання вартості і трудомісткості при збільшенні масштабу;
- недостатньо ефективний контроль, обумовлений труднощами відбору проби;
- складнощі у визначенні і контролі рН, концентрації кисню.

Необхідно відзначити, що застосування мікро носіїв усуває ці недоліки. Існує багато різних різновидів цього способу культивування. :

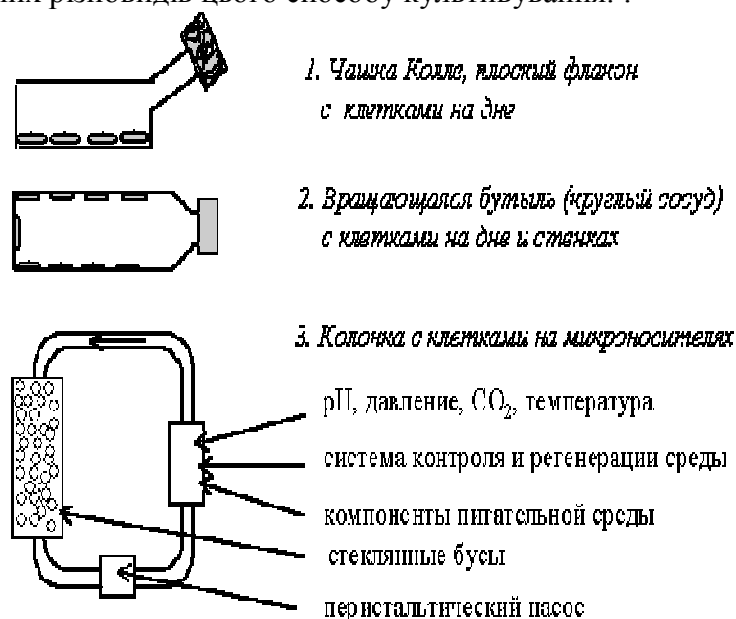


Рис.8.1. Культивування в плоских флаконах (матрацах).

2. Культивування в бутлях, що обертаються, коли в кожен момент часів 1520% поверхні бутля покрито живильним середовищем, а клітки знаходяться поперемінно то в середовищі, то в повітрі.

3. Культивування в колонках на мікро носіях, які виступають щільно упаковані, не зміщуються скляні наміста діаметром 35 мм, стопка пластин і ін., а живильне середовище омиває їх, протікаючи зверху вниз.

8.3.Промислове культивування тваринних клітин

Визначення факторів, які впливають на процеси масового культивування тваринних клітин та отримання продуктів життєдіяльності. На сьогоднішній день існує проблема промислового отримання нетрадиційних біопродуктів - інтерферонів, лімфокінів, ферментів, медіаторів росту, гормонів. Це пояснюється тим що, ці продукти закодовані 1 геном, тому її можна отримувати використовуючи технології рекомбенетної ДНК. А технології в яких використовують складні молекули, в ході біосинтезу яких відбувається проведення трансляційних модифікацій – моноклональні антитіла, отримують з використанням технології масового культивування клітин тварин.

Таблиця 8.1 – Характеристика критеріїв

критерії	клітини тварин	генетично модифіковані
----------	----------------	------------------------

		організми (прокаріоти аріоти)
стабільність штаму	мінна	мінна
живильні потреби	складні	прості
середовище (вартість)	висока	низька
Цільність клітин	низька	висока
продуктивність швидко утворення біомаси	низька	висока
контроль процесу	складний	простий
масштабування процесу	складний	простий
якість продукту	висока	низька
стабілізація продукту	нестабільний	вже стабільний
обробка продукту	швидко	складна

Аналіз даних свідчить, про те що масове виробництво сприятиме використанню технології рекомбінантної ДНК, але якість продукції вище у технології тваринних клітин.

На технологію отримання якісного продукту з тваринних клітин впливає певний набір фізичних та фізико-хімічних факторів середовища. Фізичні параметри середовища культивування клітин визначаються конфігурацією біореактору та підведеною потужністю. Ввід в реакцію хімічних речовин залежить від складу середовища. Продуктивна життєздатність клітин оказує вплив на 2 рівня вводу – фізичний та хімічний (рост та агрегація клітин та виділення продуктів. Загальний результат взаємодії біологічних та фізичних, хімічних факторів визначає стан клітинної популяції.).

Про якість культури тваринних клітин судять за даними про виміри параметрів – на морфологічному та фізичному рівнях, чисельні значення яких умовні тому що низької якості використано методи аналізів – чисельність клітин.

Оптимізація процесу культивування тваринних клітин залежить від – покращення методів отримання клітинного штаму (селекція, мутація, генетична рекомбінація) та покращення умов процесу контролю та регулювання параметрів; підвищення якості складу середовища; стимуляція стадій процесу та культивування; вибір надійної техніки культивування (конфігурація біореакторів та його характеристики); використання адекватного методу культивування (відчинена та замкнута системи, гомогенна та гетерогенна, фільтрація та діаліз).

8.3.Будування процесів культивування з урахуванням біологічних аспектів

В технологічному прояві оптимізація систем культивування тваринних клітин ін вітро можлива в 2 напрямках маніпуляцій: шляхом покращення генотипів клітинних штамів та шляхом будування та управління процесом таким чином, щоб забезпечити оптимальну фенотипичну експресію генетичного потенціалу данного штаму.

Склад системи для культивування уявляє собою композицію з 3 основних елементів:

1.Техніка культивування, котра включає в себе конфігурацію біореактору, характер суспендування, перемішування або іммобілізація популяції клітин.

2. вірний вибір типу процесу культивування (циклічний, циклічний з підпиткою, безперервний – тобто рух фаз в межах або поблизу реактору).

3. Параметри оцінки та керування.

Будування системи культивування та розробки реакторів, техніки суспендування клітин або підтримка їх за допомогою матриць, методологія забезпечення необхідними живильними речовинами – слід проводити з урахуванням потреб клітин та особливостей їх росту та утворення продуктів.

Важливі характеристики клітин, які враховують при конструюванні систем культивування та отримання продуктів ін вітро.

Таблиця 8.2 – Характеристика матриць та їх необхідності

тип росту	використання підтримуючої матриці
	матриця не потрібна
	адгезивний тип
	число генерацій обмежено
	число генерацій не обмежено
	залежить від щільності клітин
кінетика росту	синхронний або асинхронний тип росту
	експоненціальний ріст
	швидкість росту обмежена
	стаціонарний ріст – без розмноження
кінетика утворення продуктів	пов'язана зі швидкістю росту
	пов'язана з певною фазою росту
	пов'язана з клітинним циклом
	не пов'язана з ростом
	інтраклітинне виділення
регулювання утворення	індукування (депресія)
катаболітів	подавлення катаболітом
	інгібування за принципом зворотного зв'язку – регулювання
	зв'язання з медіатором
	взаємодія клітина – хазяїн – вірус
	взаємодія клітина-клітина (складне перекреснення)

8.4. Типи конструкції біореакторів для культивування тваринних клітин.

З інженерної точки зору розрізняють 2 принципи культивування клітин: вирощування на розділі фаз газ/тверде середовище та використання техніки глибинного культивування (клітини знаходяться в рідкій фазі).

Принцип техніки культивування глибинного можна застосовувати для 2 типів клітин: до тих ріст яких залежить від прикріплення до твердої поверхні та до тих які ростуть в суспензіях. Методи котрі використовують при глибинному культивуванні клітин тварин Рис.8.2.

В статичній культурі масопередача між клітинами (біофаза), живильним середовищем (рідка фаза) та газовою сумішю обмежена дифузійним транспортним феноменом. Швидкість масопередачі через кордон фаз будь-якої розчиненої речовини описується рівнянням:

$$ШМП = K_L \cdot A \cdot (C - C_L)$$

Де K_L – коефіцієнт швидкості для даної речовини та поверхневого натягнення рідини; A – площа – міжфазної поверхні; C – теоретична концентрація розчиненої речовини в рівноважних умовах без використання; C_L – фактична концентрація, з якою зустрічаються клітини.

Визначення напрямків застосування тих чи інших систем культивування тваринних клітин.

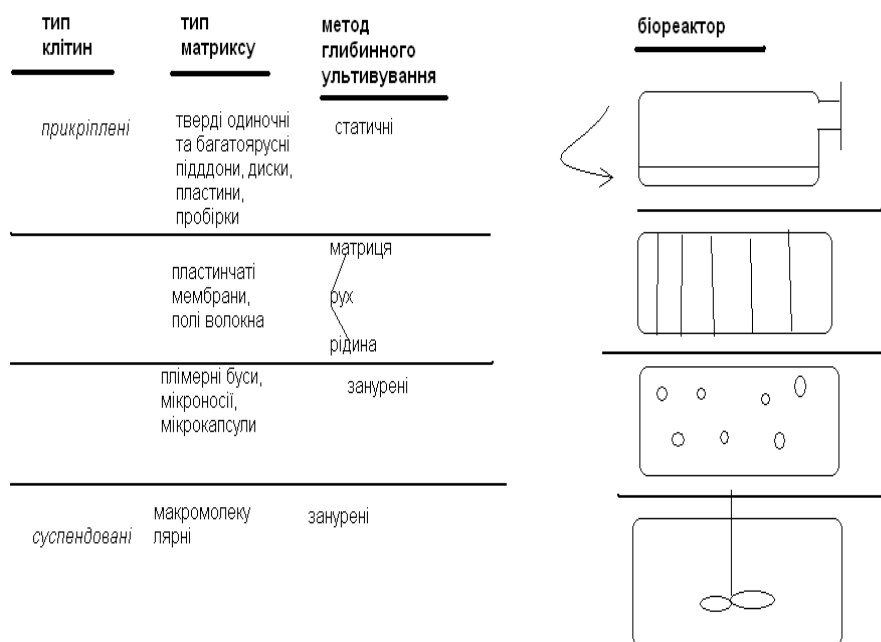


Рис.8.2 – Методи культивування

Поведінка клітин різноманітна при зміні впливу навколишнього середовища та градієнту концентрації живильних речовин та медіаторів. В замкнених системах (циклічних) культурах концентрація живильних речовин з часом знижується, накопичуються продукти обміну – відходи. Відчинені системи з безперервним підводом живильного середовища та вилученням відпрацьованого середовища більш наближені до ситуації в вітро.

В цілосних живих організмах ефективні циркуляційні системи доставляють живильні середовища до клітин та видаляють продукти обміну – відходи, забезпечуючи тим самим стабільні умови навколишнього середовища. З такої точки зору відчинена система є найбільш оптимальною, так в ній є стабільний стан середовища. Необхідно відмітити, що залежна від температури інактивація (небіологічна) чутливих компонентів в відкритих системах культивування також мінімальна, так як ці компоненти постійно вводять в культуру з живильним середовищем в ідеальній концентрації та дуже швидко використовуються клітинами. Цільна система культивування складається виключно з технічних елементів, які забезпечують масопередачу до занурених в рідину або іммобілізованих, розмножуваних та нерозмножуваних клітин з урахуванням методичних елементів (циклічна або безперервна, гомогенна або гетерогенна культура). Комбінація конкретних методів та технічних елементів для будування систем культивування залежить від типу, кінетики, способу культивування та регулювання росту та утворення цільових продуктів. Систематизована оцінка процесів представлена на рис. (див. нижче), в ній сумовані данні про 3 позначок визначили:

X – щільність клітин, S – концентрація субстрату, з котрою фактично зустрічаються клітини, специфічна для даних клітин швидкість перетворення субстрату – Q .

В циклїчних реакторах (традиційна система) зростаючі клітини експонізуються до постійно змінного середовища. Після інокуляції клітин в середовище, клітини ростуть, живильні середовища бідніють, а продукти обміну накопичуються.

На ранніх фазах циклїчної культури швидкість перетворення субстрату неприродно збільшується, так як більша частина клітин, котра привикла до гомеостатичних концентрацій в вітро, не піддається контролю потреб та рівню перетворень субстрату, підвищена акумуляція продуктів – відходів, а також збільшення витрат лабільних матеріалів середовища внаслідок їх інактивації при фізіологічному розвитку культури на останніх фазах циклїчного культивування.

Фізіологічна поведінка циклічних систем, характеризується постійно змінною S , змінням Q , та низькою щільністю клітин наприкінці процесу.

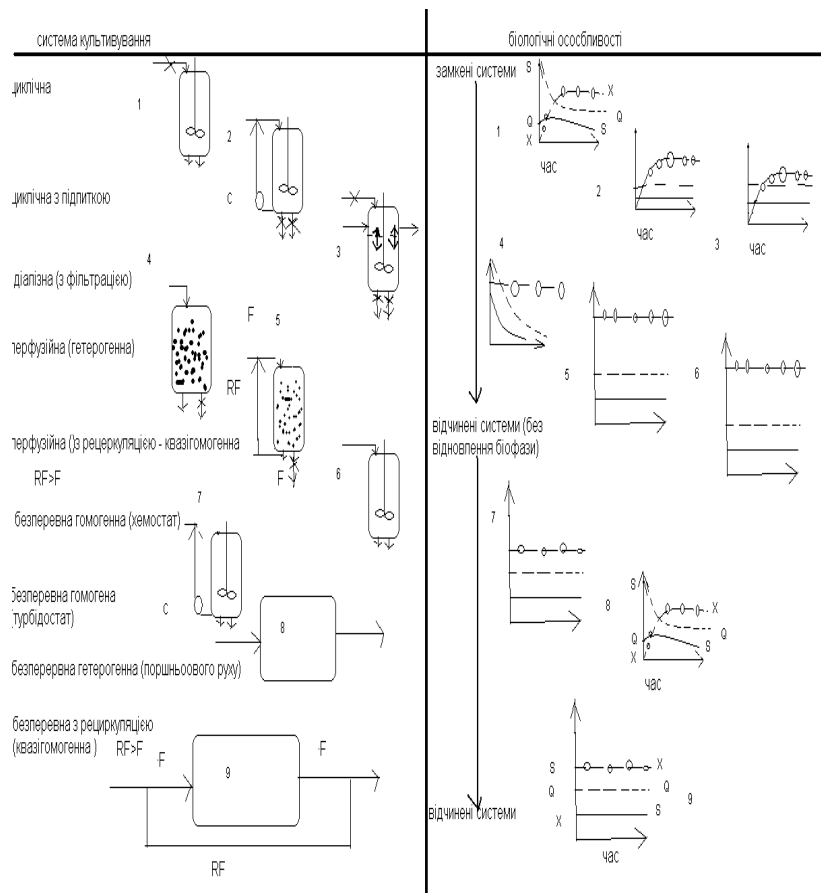


Рис.8.2 – Характеристика біореакторів

Фізіологічні параметри можна суттєво змінювати якщо змінити або покращити щільність клітин, якщо замкнута система послідовно зміниться частково або повністю відкритою системою. В циклічних системах з підпиткою живлення підтримується в необхідних концентраціях шляхом управління підпиткою; тим самим відходи та клітини з системи не видаляються. В результаті Q , S стабілізуються на постійних рівнях, а загальна щільність клітин та урожайність в розрахунку на 1 л живильного середовища збільшується. В системах культивування, де клітини затримуються завдяки фільтрам або молекулярним ситам, культура безперервно заливається свіжим живильним середовищем – перфузійні системи. Умови для розвитку культури в них сприятливіші ніж в замкнених системах, завдяки чому можна підтримувати клітини живими при високих щільностях популяцій. Різні форми перфузійних культур, яких суспендовані клітини затримуються за допомогою фільтрів або іммобілізовані на бусинках, забезпечують умови розвитку, які подібні умовам in vitro. Ці форми підходять для культивування клітин усіх типів. Перфузійні системи особливо придатні для нерозмножуючихся (стаціонарна фаза) клітин з обмеженою тривалістю життя і коли кінетика утворення продукту типова для випадків які не пов'язані з ростом клітин (продукування урокенази, моноклональних антитіл). Варіанти відчинених систем (безперервно-проточних) систем культивування, використовуються лише тоді перманентних клітинних ліній. Самою простою відкритою системою є хемостат, в якій удільна швидкість росту культури обмежена концентрацією кінцевого реагенту і підтримується в самобалансованому стані встановленою рівновагою. Турбідостат уявляє собою специфічну форму гомогенної безперервної культури з складеним станом, який підтримується за допомогою зовнішньої контрольної петлі, котра пов'язана з ростом; при цьому постійно відбувається підтримання швидкості росту на максимальному рівні. Для масового продукування клітин ефективною системою є хемостат, так як

живильні компоненти подводяться до клітин в низьких і вірно збалансованих концентраціях, а небіологічна інактивація чутлих субстратів середовища (мінімальна).

Гетерогенний безперервно - проточний реактор - реактор поршньового протікання – уявляє собою більш теоретичний інтерес. Істинна або досконала неомогенність в реакторі дає можливість досягнути фізіологічного стану, який за характером простірної (пространственного) розподілу елементів реакційного середовища в одиницю часу порівнюється з циклічною культурою. Реактор поршньової дії характеризується фазою росту циклічної культури, але не залежить від часу. Це пояснюється тим що: 1 – якість перемішування має більш велике значення для фізіологічного розвитку культури, 2 – в серійному каскаді декілька гомогених безперервно-проточних реакторів, які в свою чергу уявляють собою реалізацію типу реактора поршньової дії, можна на практиці репродуциувати усі фази циклічної культури. Гетерогенні безперервно-проточні системи культивування необхідно використовувати в тих випадках, коли клітинні штами тварин –реципієнтів за допомогою техніки рекомбінатної ДНК клонуються та можуть бути стимуляторами.

8.5. Безперервно-проточне культивування клітин тварин

Хоча метод безперервно-проточного культивування зайняв в даний час міцне положення і є важливим засобом досліджень в мікробіології, багато біологів, що мають справу з тваринними клітинами, незнайомі з ним або вважає, що в цілому їх влаштовують традиційні методи культивування клітин тварин. До недавнього часу було відомо лише декілька повідомлень про спроби вирощування клітин тварин в безперервно-проточній культурі. Загалом, такі системи культивування поки привертають невелику увагу. Ухваленню їх в методичний арсенал багатьом дослідникам заважає уявна складність безперервно-проточних культур. Проте насправді основний принцип роботи таких систем культивування вельми простий, а використовувана при цьому апаратура значно менш складна, ніж інша апаратура, звичайно вживана в лабораторіях. Доведено, що побоювання відносно зростання ризику контамінації під час тривалих операцій культивування багато в чому перебільшені. У даному розділі зроблена спроба показати, що безперервно-проточні культури стосовно культивування клітин тварин мають ряд переваг.

8.6. Циклічна культура

8.6.1. Обмеження звичайної циклічної культури

Традиційно клітини тварин культивують в циклічній культурі у вигляді суспензій або моношарів. Циклічна культура є замкнутою системою, в якій клітини інокулюються в певну кількість поживного середовища, що міститься у відповідній судині. Температура культури встановлюється на необхідному рівні, після чого клітинам надається можливість здійснювати цикл розвитку і розмноження. Після того, як розмноження клітин відбулося, поживні речовини витрачені і в середовищі накопичилися метаболіти, умови для культивування різко погіршуються. Ці зміни, у свою чергу, впливають на метаболізм клітин і кінець кінцем приводять до припинення їх розмноження.

8.6.2. Циклічна культура з підживленням середовища

Замкнуті циклічні культури складаються з ряду перехідних станів, важких для визначення і ще важких для управління ними. Була зроблена безліч спроб поліпшити принцип циклічного культивування шляхом підживлення культури субстратом (періодично або безперервно) або ж шляхом заливки культури поживним середовищем. Періодичне заміщення постійної частки клітинної суспензії свіжим середовищем, що є найпоширенішим засобом субкультивування клітин тварин, часто позначається як безперервне або напівбезперервне культивування. Фактично ж даний тип культури, названий об'ємно-дольовою культурою, є тільки послідовністю ряду циклічних культур, в яких частина старої культури використовується

як інокулята. Об'ємно-дольові культури застосовуються для отримання в напівпромислових масштабах клітин Намалва при виробництві інтерферону для людей.

У циклічній культурі з підживленням система безперервно забезпечується середовищем з відповідним збільшенням об'єму культури. Оскільки швидкість потоку середовища, що підводиться, підтримується постійною, а об'єм культури прогресивно збільшується, то швидкість розбавлення і, отже, швидкість росту культури прогресивно знижуються. Якщо потім з певними інтервалами частину культури відбирати, то культура зможе підтримуватися більш менш необмежений час. Циклічна культура з підживленням виявилася доброю системою для отримання таких речовин, як інтерферони, синтез яких досягає максимуму після того, як клітини входять в стаціонарну фазу.

Для постачання культур клітин тварин свіжим середовищем створено декілька пристроїв. У таких культурах клітини утримуються за допомогою деяких механічних засобів, наприклад діалізуючих мембран або фільтрів, які забезпечують заміну виснаженого середовища на свіжу за межами культури. Хоча такі методи, поза сумнівом, дозволяють досягати високої густини клітин, вони, проте, мають ті ж основні обмеження циклічної культури, про яких мовилося вище. Іншими словами, вони є замкнутими системами (у яких залишаються клітини або клітини сумісно).

У таких культурах клітини утримуються за допомогою деяких механічних засобів, наприклад діалізуючих мембран або фільтрів, які забезпечують заміну виснаженого середовища на свіжу за межами культури. Хоча такі методи, поза сумнівом, дозволяють досягати високої густини клітин, вони, проте, мають ті ж основні обмеження циклічної культури, про яких мовилося вище. Іншими словами, вони є замкнутими системами (у яких залишаються клітини або клітини сумісно з поживними речовинами), що складаються з серій перехідних станів і досягають кульмінації зрештою в загибелі. Вказані труднощі долаються у відкритих системах, таких, як безперервно-проточні культури, в яких є підведення субстрату і відведення клітин і клітинних продуктів.

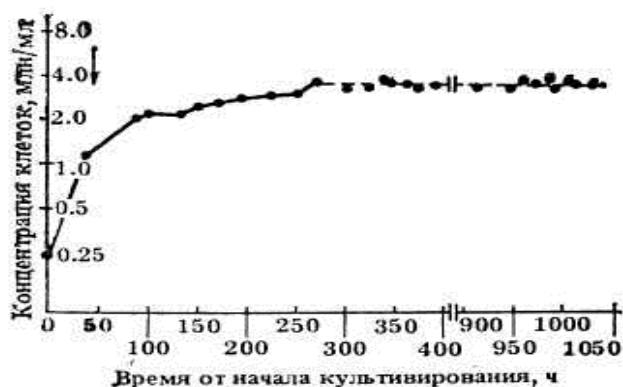


Рис.8.4. Формування сталого стану хемостатної культури клітин Namalwa при швидкості розбавлення $0,693 \text{ сут}^{-1}$.

Стрілка показує початок безперервно-проточної культури. Середня величина концентрації клітин при сталому стані культури « $\pm$ » стандартне відхилення рівне $3,6 \pm 0,2 \times 10^6$ клітин/мл.

8.7. Безперервно-проточна культура

Хемостатна безперервна культура заснована на принципі, встановленому Монадом, який полягає у тому, що при субоптимальних швидкостях росту швидкість росту організму визначається концентрацією єдиного субстрату, лімітуючого зростання. Теорія безперервно-проточного культивування спочатку була сформульована Монадом і незалежно від нього Новіком і Сзілардом, які ввели у вживання термін «хемостат». На практиці хемостат складається з культури фіксованого об'єму, в яку подається поживне середовище з постійною швидкістю. Середовище змішується з клітинами (достатньо ретельно, щоб задовольняти вимогам ідеального або «повного» змішування), які разом з середовищем з тією ж швидкістю покидають культуру. Культура спершу починається як звична циклічна, а

потім в період експоненціального зростання харчується середовищем, що містить єдину поживну речовину, концентрація якого обмежує зростання клітин; всі інші поживні речовини подаються в надлишку (див. рис.1.). Потім концентрація клітин зростає до значення, підтримуваного концентрацією лімітуючої зростання поживної речовини, тобто створюються умови, при яких швидкість вимивання (швидкість, з якою культура розбавляється свіжим середовищем) менше, ніж максимальна швидкість росту клітин. Зменшення концентрації лімітуючої зростання поживної речовини уповільнює швидкість росту клітин до тих пір, поки швидкість росту порівнюється із швидкістю вимивання. У такому разі досягається сталий стан, при якому як густина клітин, так і концентрація субстрату будуть постійними. Концентрація клітин в сталому стані контролюється концентрацією єдиного обмежуючого зростання компоненту середовища, а швидкість росту клітин — швидкістю підведення цього компоненту до культури.

У сталому стані швидкість росту клітин (μ) рівна швидкості розбавлення (D), тобто приватному від розподілу швидкості потоку середовища (f) на об'єм культури (V):

$$\mu = D = \frac{f}{V} \text{ сут}^{-1}.$$

Оскільки об'єм культури підтримується постійним, зміна швидкості росту клітин може обумовлювати зміну швидкості потоку середовища. Час подвоювання (td) культури можна визначити по виразу:

Хемостат є саморегульованою системою: тимчасове зниження концентрації клітин, типової для сталого стану, викликає відповідне збільшення швидкості росту клітин, внаслідок чого відновлюватимуться умови сталого стану. Збільшення концентрації клітин вище за рівень концентрації при сталому стані викличе протилежний ефект і знову в результаті будуть відновлені умови сталого стану.

На додаток до хемостатної культури, в якій густина клітин «підстроюється» під конкретну фіксовану швидкість потоку, описаний інший тип гомогенної безперервно-проточної культури, відомої як турбідостат. У турбідостаті швидкість подачі середовища змінюється так, щоб підтримувати густину клітин при конкретному фіксованому значенні. Це звичайно здійснюється за допомогою фотоелектричної камери, яка визначає каламутність культури і приводить в дію насос тоді, коли вимагається додати до культури свіже середовище, тобто у випадку, якщо густина клітин перевищує вибраний рівень.

Достоїнство такої системи культивування полягає у тому, що вона дає можливість культивувати клітини з їх максимальною швидкістю росту в надлишку субстрату. Оскільки швидкість росту клітин в даному випадку не фіксована, то в такій системі існує сильний стимул для селекції організмів, що швидко ростуть; даний метод був використаний для автоматичної селекції бактерій, резистентних до антибіотиків. Основний недолік турбідостата полягає у тому, що він функціонує задовільно тільки при швидкостях росту, що наближаються до максимальної, коли концентрація клітин із зміною швидкості розбавлення варіює досить швидко. Проте турбідостат працює достатньо точно в таких умовах, в яких хемостат функціонує менш задовільно, оскільки при високих швидкостях розбавлення, що наближаються по чисельному значенню до максимальної питомої швидкості росту, популяція клітин вимивається.

Отже, дві вказані системи до певної міри доповнюють одна одну.

У літературі описана безліч варіацій турбідостата, в яких контроль і управління зростанням ґрунтуються на визначенні продукту, який пов'язаний із зростанням. Всі вони об'єднані терміном «продуктостат» і включають системи, засновані на моніторингу рН — «фауксостат» і визначенні продукovanого CO₂ — «CO₂-стат». Застосовують такі системи у великомасштабному виробництві ряду цільових продуктів. З появою ферментних електродів для вимірювання таких речовин, як пеніцилін і холестерол, продуктостати повинні знайти широке застосування для промислового виробництва багатьох речовин.

8.8. Культивування клітин тварин в безперервно-проточній системі

У хемостаті культивували багато ліній клітин тварин (таб.). У більшості досліджень клітини культивували в середовищі, що містить сироватку, при обмеженні зростання клітин глюкозою або за умов, в яких обмежуюча зростання поживна речовина не була ідентифікована. Обмеження зростання глюкозою в культурі тваринних клітин, культивованих в комплексному середовищі, що містить сироватку і амінокислоти, і за умов, в яких якась частина глюкози неповністю окислюється до молочної кислоти, не можна порівняти з обмеженням зростання єдиним джерелом вуглецю в культурі мікроорганізмів. Хоча теорія безперервного культивування ґрунтується на допущенні про те, що розмноження клітин обмежується єдиною поживною речовиною, стає очевидним, що за певних умов швидкість росту будь-якого організму може одночасно обмежуватися двома або навіть великим числом речовин. Неясно, чи може швидкість росту організму в даний момент часу обмежуватися тільки одним субстратом або обидва субстрати впливають на швидкість росту організму? Було зроблене припущення, що одна поживна речовина може контролювати швидкість розмноження клітин, тоді як інше, кінцевим кінцем, контролюватиме рівень цього розмноження. Проте відомо, що мишачі клітини LS можна культивувати в хемостаті в хімічно певному безбілковому середовищі при обмеженні зростання глюкозою і холіном. В даному випадку було досягнуте найбільше наближення до мікробних систем, в яких зростання контролюється за допомогою обмеження його єдиним джерелом вуглецю.

Більшість досліджень хемостатної культури клітин тварин проведена з клітинами мишачої лейкемії L 1210. Мишачі клітини LS ідеально підходять для хемостатних досліджень, оскільки, розмножуючись в суспензійній культурі, вони зберігають високу питому швидкість росту, не утворюють конгломератів і не прилипають до поверхонь. Пристінкове зростання в безперервно-проточному культивуванні може створювати скрутно переборні проблеми, оскільки, окрім небезпеки блокування ліній для середовища і переливних трубок, він може викликати серйозні відхилення від прогнозованого функціонування хемостату, зобов'язані безперервною інокуляцією клітин із стінок судини для культивування. Клітини мишачої лейкемії L 1210 можуть без праці культивуватися в хемостаті в умовах обмеження зростання глюкозою, але без контамінації, викликаной *Mycoplasma*. Нам вдалося одержати культури в сталому стані з клонів клітин L 1210, контамінованих *Mycoplasma*. Клітини L 1210 чітко реагували на обмеження глюкозою, сприяюче стабілізації рН культури. Фактично рН культури в цьому випадку можна підтримувати на рівні $7,4 \pm 0,1$ просто за рахунок безперервного газування вмісту судини для культивування і резервуару для середовища повітрям з добавкою 5% CO₂. Клітини тварин можна культивувати в устаткуванні ферментації, наприклад в апаратах «Біофло» фірми Нью-Брансвик* або в простій апаратурі, зібраній з легко доступних лабораторних виробів з скла (рис.2). ССкляна судина для культивування з магнітною мішалкою (150—300 об/мин) приєднана за допомогою бічного переливного патрубку до судини-збірки. Переливний патрубок розміщений так, щоб робочий об'єм судини для культивування (300 мл) складав приблизно половину повного об'єму. Поживне середовище, що зберігається в охолоджуваному резервуарі (4°C), підводиться в судину для культивування з постійною швидкістю через перистальтичний насос (MHRE-2 Watson — Marlow, Falmouth, U. Do.)

Як резервуар для середовища і збірки для культури, що переливається, можуть служити судини місткістю 1 л з силіконовими сальниковими ущільнювачами і сполучними трубками для культивування. Всі інші трубки і сполучні вузли повинні бути виконані з неіржавіючої сталі або з силіконової гуми. Резервуар для середовища, судина для культивування і приймач для культури, що переливається, оснащуються бобишками (стовбурами) для асептичного додавання середовища і відведення культури. Судина для культивування може бути також оснащений додатковими бобишками для розміщення датчиків

pH і кисню. Датчики і прилади для моніторника повинні бути промислового виготовлення. Апаратура комплектується повітряними фільтрами, що витримують автоклавування (міліпор) і стерилізацію в зборі.

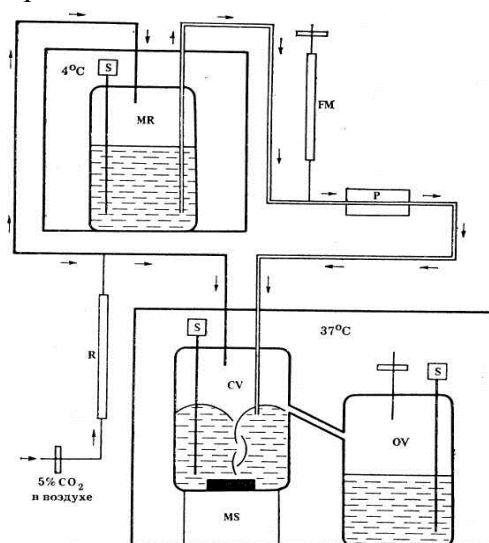


Рис.8.5. Апаратура для хемостатного культивування мишачих клітин L1210.

CV — судина для хемостатного культивування; *MS* — магнітна мішалка; *OV* — приймач суспензії, що переливається; *MR* — резервуар з середовищем; *P* — перистальтичний насос; *FM* — вимірник потоку середовища; *S* — пробоотбірник; *R* — ротаметр

Циклічне культивування клітин L1210 починається в хемостатній судині, заповненій незамінним мінімальним середовищем Іглі, що збагачить 10%-ний сироваткою крові коня, при змісті клітин, який становить 105 мл. В період експоненціального розмноження культура підживляється поживним середовищем, що містить глюкозу в обмежуючій зростання концентрації (1,0 мг/мл) при заданій швидкості розбавлення. Концентрація клітин підвищується до значення, відповідного обмежуючій зростання концентрації глюкози в поступаючому середовищі (див. рис.8.5).

Сталий стан культур L 1210 досягається після регулювання протягом безперервної 100—450-годинної роботи хемостата. Тривалість регулювань пропорційна швидкості розбавлення хемостата. Наприклад, якщо допустити, що розмноження клітин не відбувається, тоді для зниження концентрації клітин в хемостаті до 1 % від первинного значення потрібно потік середовища, еквівалентний п'яти змінам об'єму. При швидкості розбавлення 1 діб⁻¹ для цього потрібно 5 діб, а при швидкості розбавлення 0,1 діб⁻¹.

50 діб. Тривалими періодами регулювання, необхідними для досягнення культурами клітин L 1210 сталого стану, можна частково пояснити невдалі спроби деяких дослідників одержати культури клітин тварин в хемостаті при стабільно сталому стані.

Культури мишачих клітин L 1210 в сталому стані характеризуються постійними значеннями багатьох параметрів (табл.2). Сталі стани цих культур можна вважати досягнутими (істинними), оскільки відхилення середнього значення кожного параметра для сталого стану має ту ж величину, як і стандартне відхилення результатів їх відповідних аналізів (рис.3). Культури мишачих клітин L 1210 регулярно підтримували в хемостаті безперервно впродовж більше 1000 ч. При цьому тривалість окремих сталих станів культури досягала іноді 600 ч.

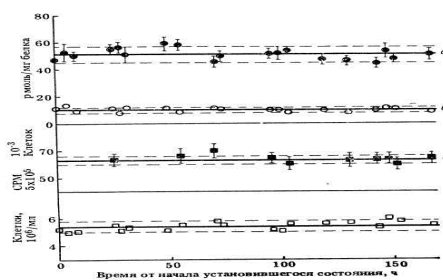


Рис.8.6. Хемостатна культура клітин L1210 в умовах сталого стану при швидкості розбавлення 0,5 діб⁻¹ (7d=33,3 ч). Початкова концентрація глюкози рівна 1 мг/мл

a — внутріклітинна концентрація циклічної АМФ (середнє значення в умовах сталого стану $51,3 \pm 6,3$ моль/мг білка); *b* — внутріклітинна концентрація циклічної ГМФ (середнє значення в умовах сталого стану $10,5 \pm 1,8$ моль/мг білки); *y* — концентрація клітин (середнє значення в умовах сталого стану $5,4 \pm 0,4 \times 10^6$ клітин/мл); *z* — включення ³H-тимідину в облягаючий кислотою матеріал (середнє значення в умовах сталого стану $63,382 \pm 3,273$ СРМ/5X105 клітин). Середнє значення для сталого стану при стандартному відхиленні характеризують суцільні лінії між переривчастими паралельними лініями. Межі помилки характеризують розкид стандартного відхилення для даної крапки.

Стабільні сталі стани культур клітин L 1210 спостерігалися в хемостаті при швидкостях розбавлення в межах від 0,1 доб⁻¹ ($td=166,3$ год) до 2,0 діб⁻¹ ($td=8,3$ год). Було встановлено, що залежність між концентрацією клітин в сталому стані і швидкістю розбавлення добре узгоджується з теоретичними кривими густини клітин і концентрації глюкози, обчисленими по рівняннях Монада з використанням значень констант, експериментально визначених для клітин L 1210. Проте при високих швидкостях розбавлення спостерігалися істотні відхилення від теоретичних кривих. Наприклад, сталі стани культур клітин L 1210 спостерігалися при швидкостях росту, перевищуючих максимальну питому швидкість росту цих клітин (у циклічній культурі ця швидкість була рівна 1,75 доб⁻¹). Аналогічні впливи спостерігалися в хемостатних культурах мікроорганізмів. Відхилення від розрахункових величин, мабуть, обумовлені недостатнім перемішуванням культури.

У хемостатних культурах мікроорганізмів, обмежених глюкозою, при швидкостях росту нижче ^{1/10} максимальної питомої швидкості росту врожайність клітин зменшується, що свідчить про підвищене споживання енергії на підтримку. Проте при порівнянних швидкостях розбавлення врожайність клітин L 1210 стабільна, хоча можливо, що при інших швидкостях розбавлення вона буде нижчим, і не дивно, що в поведінці хемостатних культур мікроорганізмів і клітин тварин спостерігаються відмінності.

Було встановлено, що вихід клітин L 1210 з хемостата характеризується розрахунковій кривій, побудованій по рівнянню (1) Монада. Максимальний вихід був досягнутий при швидкості розбавлення 1,3 діб⁻¹. При вищих швидкостях розбавлення і підвищеної швидкості потоку концентрації клітин в сталому стані були значно нижче, а вихід клітин L 1210 різко падав.

Результати наших експериментів по культивуванню мишачих пухлинних клітин L 1210 в хемостаті показали, що принципи безперервного культивування, вживані при вивченні мікроорганізмів, в значній мірі застосовні до культивування клітин тварин.

8.9.Отримання клітин в хемостаті

Одним з принципових достоїнств хемостатних культур є те, що вони дозволяють одержувати великі кількості клітин тварин в точно фіксованому фізіологічному стані.

Клітини можна культивувати в хемостаті при великому наборі єдиних у своєму роді умов, широкій різноманітності обмежуючих зростання умов і великому діапазоні швидкостей росту.

* Циклічне культивування тривало 3 сут до отримання в популяції максимальної густини ($2,5 \times 10^6$ кліток/мл). Коли доза інокуляції складала $0,2 \times 10^6$ клітин/мл, витрачалося, як мінімум, 24 ч «непродуктивні» часи між суміжними циклами.

** Швидкість розбавлення $0,3 \text{ діб}^{-1}$.

Розглянемо виробництво клітин L 1210 в хемостатній культурі. Врожайність клітин, виражена як кількість клітин, вироблених на 1 міліграм глюкози, або як кількість клітин, вироблених на 1 мл середовища, помітно вища в порівнянні з даними для циклічної культури (табл.3). Отже, застосування хемостату дозволяє понизити вартість виробництва, особливо якщо як обмежуючий зростання компонент середовища будуть використані дорогі сироватка або ростовий чинник. Але і по показнику продуктивності, тобто по кількості клітин, вироблених за одиницю часу, хемостат дійсно перевершує циклічний метод. Так, в наших дослідженнях максимальний вихід з хемостата місткістю 300 мл складав $66,4 \times 10^6$ клітин/ч, або 8,24 мг/ч по сухій речовині. Іншими словами, в хемостаті вироблялося в одиницю часу в 8 разів більше клітин, ніж в звичній циклічній культурі. Це, безумовно, має велике значення для великомасштабного виробництва клітин тварин або продуктів життєдіяльності цих клітин.

Інші переваги, забезпечувані хемостатними культурами, зводяться до можливості строго контролювати умови культивування і автоматично управляти ними, зменшувати розмір судини для культивування при отриманні заданої кількості клітин, скорочувати витрати часу на непродуктивні операції (час, що витрачається на стерилізацію, інокулювання, збір урожаю і т. д.) і виробляти клітини строго постійного фізіологічного стану відповідно до потреб.

8.10 Виробництво клітинних продуктів в хемостаті

Умови, оптимальні для максимальної швидкості розмноження клітин, можуть виявитися неоптимальними для максимального отримання конкретного клітинного продукту. До того ж умови, оптимальні для утворення продукту, в циклічній культурі можуть бути досягнуті тільки на короткочасний період часу або взагалі не досягаються. Окрім цього, утворення продукту життєдіяльності клітини може інгібуватися самим цим продуктом або ж продукуванням іншого клітинного продукту або метаболіту. Клітинний продукт, що утворився, може в свою чергу інгібувати розмноження клітин.

Переваги хемостату полягає у тому, що він дозволяє не тільки встановлювати різні умови середовища, але і підтримувати їх нескінченно довго. Продукти життєдіяльності клітини безперервно віддаляються з хемостатної культури, запобігаючи інгибуванню утворенням продукту або розмноженню клітин. Більш того, реальне застосування двохступеневого хемостату, в якому в першому ступені створюються умови, оптимальні для максимального виходу клітин, а в другій — для максимального утворення продукту.

Виробництво продуктів життєдіяльності клітин тварин в хемостатній культурі поки обмежене дослідженнями у області отримання вірусів і інтерферону.

8.10.1. Виробництво вірусів в хемостаті

Хемостатні культури представляють можливості для збільшеної продуктивності і підвищеної однорідності одержуваних продуктів в порівнянні із звичними методами виробництва вірусів в циклічних культурах. Вказані якості створюють важливі переваги саме для такого методу виробництва вірусів з метою використовування їх при приготуванні вірусних вакцин або як індукторів інтерферону.

Вибір системи безперервно-проточного культивування залежить від характеристик системи вірус — клітка. Вірус, який викликає персистуючу інфекцію клітини без цитопатичного ефекту і без дуже різкого зниження швидкості росту клітини, може розмножуватися в клітинах, культивованих в одноступінчатому хемостаті. Проте вірус, що викликає в клітині літичну інфекцію, необхідно культивувати в другому ступені двохступеневого хемостату, тоді як клітини організму-господаря — в першій. Є повідомлення про успішне розмноження вірусу краснухи в клітинах HeLa, культивованих. Є повідомлення про успішне розмноження вірусу краснухи в клітинах HeLa, культивованих в одноступінчатому хемостаті. Оpubліковані також дані про виробництво вірусу краснухи в хемостатних культурах клітин ВНК. Було відмічено, що після 40 діб безперервної роботи хемостату стійко підтримувався титр продукowanego вірусу, зміст комплементфіксуючого антигена і здатність вірусу індукувати антитіла. У результатах досліджень відмічено, що збільшення швидкості продукування вірусу відбувається при підвищенні швидкості росту клітин в хемостаті, хоча не вказано, чи підвищувалася при цьому середня швидкість продукування вірусу в перерахунку на 1 клітку. Гори описав квазі-хемостат, названий ним лізостатом, в якому вірус повно, що викликає літичну інфекцію, розмножувався в клітинах HeLa, культивованих в одноступінчатому лізостаті, а аденовірус — в двохступеновому в таких же клітинах. Проте ні в якій з цих систем умови сталого стану досягнуті не були.

8.10.2. Виробництво інтерферону в хемостаті

Інтерферон, вживаний в клінічних випробуваннях для пацієнтів з неоплазіями, виробляється в промисловому масштабі з клітин лімфоми людини (маються на увазі клітини Буркитт, лінія Namalva), культивованих у великомасштабній циклічній культурі. Проте хемостатна культура є потенційно перспективнішою системою для великомасштабного виробництва лімфобластoidного інтерферону з сироватки крові людини, оскільки ця система дозволяє одержувати високий вихід продукту у відносно менших судинах для культивування і таким чином знижувати втрати титрів інтерферону при масштабуванні. Крім того, застосування хемостату дозволяє організувати безперервне виробництво інтерферону. Він є індукованим клітинним білком, продукування якого припиняється після певного періоду, коли клітини стають стійкими до подальшої стимуляції. Слід зазначити, що безперервне культивування дозволяє тривало підтримувати відносно стабільний вихід клітин і клітинних продуктів.

У лабораторії автора цього розділу було показано, що в хемостатних культурах мишачих клітин LS можна одержати повторювану індукцію інтерферону без прояву стійкості. З обмежених глюкозою хемостатних культур клітин LS були одержані вищі титри інтерферону, ніж з таких же клітин, але культивованих при надлишку глюкози в циклічній культурі. При використуванні безбілкового середовища були також одержані препарати інтерферону відносно високої питомої активності і вільні від контамінуючих білків сироватки.

Продукування інтерферону в хемостаті опинилося незалежним від швидкості росту клітин. Клітини Namalva розмножуються в хемостаті добре, досягаючи стабільного сталого стану культур при високій густині клітин (див. рис.1). Показано, що хемостатні культури при стимулюванні можуть продукувати певні рівні інтерферону, аналогічні тим, які досягаються в циклічній культурі, за допомогою сильнодіючих вірусних індукторів. Таким чином, великомасштабне виробництво лімфобластoidного інтерферону з сироватки крові людини можна поліпшити, застосувавши для цього хемостатні безперервно-проточні культури.

8.11. Перспективи застосування безперервно-проточного культивування клітин тварин

Хоча хемостатна культура заснована на розмноженні клітин в гомогенній суспензії, клітини, зростання яких залежить від їх причіпляємості до твердих поверхонь,

можна також культивувати в суспензійній культурі, якщо їх закріпити на відповідному мікроносії. Оскільки клітини, що прикріплялися, можуть відділятися від мікроносія і повторно прикріплятися вже до нових намистин мікроносія, то з'являється можливість підводити ці намистини в культуру і тим самим одержати деякий різновид безперервно-проточної культури. Така система може виявитися придатною для продукування інтерферона-в або вакцинних штамів певних вірусів за допомогою диплоїдних фібробластів людини.

Недавно з бактерій були клоновані гени багатьох білків, що представляють не тільки науковий, але і практичний інтерес. Хоча бактерійні ферментації володіють рядом переваг відносно великомасштабного виробництва тваринних білків, проте можна одержати великий ефект у разі вироблення визначених глікопротеїнів людини, наприклад інтерферона-г в тваринних клітинах. Ген інтерферона-у сироватки крові людини на відміну від інтерферонів-б і - в містить інтрони, і тому білок також потребує після-трансляційної обробки. Введення надмірного числа копій гена людського інтерферона- г в тваринні клітини гарантуватиме коректне вироблення, глікозилацію і секрецію білка, що неможливо одержати, використовуючи мікробні клітини. З цієї причини описана вище у загальних рисах хеомостатнаякультура може використовуватися як найпереважніша система при отриманні таких білків з генетично модифікованих клітин.

8.12. Використання суспензійного культивування тваринних клітин

Існує обладнання та методи для культивування клітин, які приміняються для суспензійних культур. Техніка яка використовувалася для вирощування мікроорганізмів також придатна для вирощування тваринних клітин в суспензійному стані, але обладнання модернізоване. Встановлено основні закономірності які впливають на таваринні клітини: зведення до мінімуму турбулентності за рахунок пониження швидкості перемішування та використання мішалки спец.конструкції; показана залежність росту клітин від хімічних, фізіологічних параметрів, рН та барабтажу CO₂ та повітря. Діапазон напруги кисню сприятливіший для урожайності клітин і мінімальний для сподивання глюкози у випадку коли клітини знаходяться під тиском 40 та 80 мм.рт.ст.овбчика. Кращім реакором є використання реактора який працює за принципом пазирчатої барботажної колнки з виключно низьким вводом енергіїта зрізаючими посиленнями. Також можна використовувати реактор обємом 700 л для отримання лімфобластоїдних клітин – ерліфтного типу, котрий є енерготично екномічним. Тому більш доцільно викорстоувати реактори великих обємів, котрі працюють за принципом ерліфтів. Максимальна диссипація енергії (щільність енергії) в реакторі ерліфтного типу не залежить від розмірів реактора, в той час коли в звичайних реакторах локальна щільність дитсипуємої енергії збільшується з збільшенням розмірів реакторів. Доставка кисню не залежить від величини реактора та нею можна керувати шляхом подавання великих обємів газів в любому співвідношенні.

Контрольні запитання:

1. Яким чином можна підтримувати суспензійні клітини тварин?
2. Який склад поживних середовищ є оптимальним для розвитку суспензійних культур?
3. На чому базується принцип хеомостатного культивування тваринних клітин?
4. Які режими культивування тваринних клітин є найбільш оптимальними?

Конспект лекцій з дисципліни

«Біотехнологія рослинних і тваринних клітин» для здобувачів вищої освіти зі спеціальності 162 –Біотехнології та біоінженерія – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 133 с.

Укладач: доцент, к.т.н

Корнієнко Ірина

Підписано до друку _____ 2017, Формат _____

Обсяг _____ др.арк. Тираж - _____ екз. Замовлення _____

51918 м. Кам'янське

Вул. Дніпробудівська, 2