

Федеральное агентство по образованию
ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

В.Ж. Цыренов

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ:
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Учебно-методическое пособие

Часть 3

Издательство ВСГТУ
Улан-Удэ 2005

УДК 581.1:375.2
ББК 30.10:28.072.73

Печатается по решению редакционно-издательского совета Восточно-Сибирского государственного технологического университета

Рецензент: профессор **С.Н. Балдаев**, зав кафедрой органической и биологической химии Бурятской сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова.

Цыренов В.Ж.

Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных. Учебно-методическое пособие. - Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. - 48 с.

В работе рассмотрены теоретические основы способов и систем культивирования клеток животных и человека, применяемых в промышленной биотехнологии. Основное внимание обращено на различные варианты глубинного выращивания клеток, на применение эмбриональных и других тканей для репродукции вирусов и получения вирусных вакцин.

Пособие предназначено для студентов специальности 070100 - биотехнология, 270900 - технология мяса и мясных продуктов, 281000 - технология кожи и меха.

Ключевые слова: биотехнология, культивирование, клетки, основы биотехнологии, культивирование клеток

ББК 30.10:28.072.73
© Цыренов В.Ж., 2005 г.
© ВСГТУ, 2005 г.

Содержание

Введение	4
1. Физиолого-биохимические основы и способы культивирования (выращивания) клеток животных и человека	7
2. Системы культивирования клеток животных и человека	12
3. Глубинное крупномасштабное выращивание клеток человека и животных	15
3.1. Глубинное выращивание клеток человека и животных в нослое	18
3.2. Глубинное выращивание клеток в суспензионных культурах	19
3.3. Глубинное культивирование клеток животных в инкапсулированном состоянии	20
4. Эмбриональные и другие ткани для репродукции вирусов и получения вирусных вакцин	23
5. Получение инсектопатогенных вирусов.....	30
Основные термины и понятия	32
Список рекомендуемой литературы.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Методы клеточной биологии находят все большее распространение в различных областях современных фундаментальных и прикладных исследований. Одним из наиболее используемых является метод культивирования клеток человека, животных и растений, получивших широкое распространение во второй половине XX века. В настоящее время можно культивировать клетки практически всех тканей и органов человека, животных и растений. Культивирование клетки становится основой современных наукоемких технологий в биотехнологии и медицине, например, в биотехнологии – получение биологически активных веществ, вакцин, диагностикумов, клеток-продуцентов; в медицине – заместительная клеточная терапия, позволяющая восстанавливать поврежденные ткани (например, кожу после ожога) путем трансплантации нормальных здоровых клеток человека, выращенных *in vitro*. Открытие принципа гибридомной техники привело к получению в 1975 г моноклональных антител из гибридомных клеток – одному из наиболее замечательных событий медицины и биологии XX века.

В наши дни в промышленных масштабах в биореакторах с помощью клеток животных и человека налажено производство многочисленных вакцин и диагностикумов, производство гормонов (инсулина и др.) интерферона, ферментов, фактора свертывания крови, эритропоэтина и др. препаратов.

С развитием метода культур тканей увеличивается число областей, где используется данный метод. К ним относятся: клонирование человека и животных (Получение идентичных близнецов. Быстрое размножение высокоценных генотипов), получение трансгенных животных (т.е. организмов, содержащих во всех своих клетках чужеродный

ген и имеющих необходимые продуктивные качества), космическая биотехнология (получение сверхчистых образцов БАВ, белков, лекарственных препаратов), трансплантация эмбрионов (получение высокопродуктивных животных и др.

В перспективе с помощью метода культивирования клеток и тканей животных может быть налажено производство мышечной и других тканей, которые планируется использовать в мясной промышленности вместо сырья, получаемого в результате убоя сельскохозяйственных животных.

Клеточные культуры человека и животных (ККЧЖ) делятся на первичные, т.е. растущие ограниченное время и постоянные (трансформированные, перевиваемые) клеточные линии (культуры), растущие неограниченно долго.

Для получения первичных культур удобнее всего использовать эмбриональные ткани – кожно-мышечную, почечную, легочную и другие после предварительной дезагрегации кусочков тканей с помощью фермента трипсина. Эмбриональные клетки обладают выраженной пролиферативной активностью вне организма и характеризуются стабильностью генома.

Трансформированные клеточные линии (так называемые иначе перевиваемые культуры) интенсивно используются для фундаментальных и прикладных исследований в биологии, медицине, вирусологии, фармакологии, биотехнологии и сельском хозяйстве. Во многих учреждениях, где проводятся исследования с использованием культивируемых клеток, существуют коллекции стандартных эталонных клеточных линий, позволяющие проводить исследования и производить вакцины и другие биологически активные вещества, используя клеточный материал со строго охарактеризованными свойствами. Существует национальная все-российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений. Всероссийская коллекция клеточных куль-

тур находится в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Биотехнология культивирования клеток животных и человека развивается в 2-х направлениях:

1. Разрабатываются методы и лабораторная аппаратура, обеспечивающие управление развитием клеток в культуре для научно-исследовательских работ.
2. Разрабатывается аппаратура и технология культивирования клеток в больших (промышленных) масштабах.

Фактически культуру клеток можно получить из любой ткани. В качестве исходного материала можно культивировать кусочки органов, целые эмбрионы, нарезанные ткани, а также клетки, полученные при дезагрегации свежих тканей путем энзиматического переваривания.

Именно последний метод нашел наиболее широкое применение, т.к. он позволяет получать длительно поддерживаемые *in vitro*, хорошо пролиферирующие культуры клеток тканей.

Явным преимуществом трансформированных (перевиваемых) культур перед первичными культурами является не только неограниченный срок культивирования; они свободны от вирусов и микроорганизмов.

Перевиваемые культуры, однако, не лишены недостатков: это трансформация клеток, затрагивающая кариотип, с изменением свойств клеток, причем не исключено приобретение клетками онкогенных потенций. Поэтому для производства вирусных вакцин все-таки используются первичные культуры тканей.

1. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ (ВЫРАЩИВАНИЯ) КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Существенным преимуществом животных клеток по сравнению с бактериями является то, что протеин экскретируется из клеток, что облегчает его выделение и очистку. Животные клетки осуществляют посттрансляционную модификацию, например, гликолизирование, а это очень важно, так как гликолизированные протеины имеют более выраженные иммуногенные свойства. Кроме того, гликолизированные продукты в организме более стабильны.

Однако животные клетки уступают прокариотам по продуктивности и достигаемой концентрации продукта в среде. К тому же, культивирование животных клеток значительно сложнее, чем бактерий, по причинам сложной композиции среды и механической непрочности животных клеток в связи с их свойством расти преимущественно на поверхности. Показано, что клетки лейкоцитов периферической крови, синтезирующие γ -интерферон, имеет время удвоения 24 ч., а рекомбинантные бактерии *E.coli*, синтезирующие то же вещество – 2 ч. Кроме того, концентрация клеток *E.coli* в 400 раз выше, чем животных клеток, а концентрация продукта увеличена в 500 раз. У бактериальной культуры имеются преимущества по продуктивности системы и более низкой стоимости среды.

Несмотря на явные преимущества, бактериальные культуры на стадии ферментации, выделения целевого белка из её биомассы намного сложнее, чем из среды с животными клетками. Потери биологической активности в случае выделения нужного белка и биомассы бактерий в 1000 раз превышают потери при выделении этого белка из среды с животными клетками.

Любые клетки животного организма происходят из оплодотворенной яйцеклетки, которая со временем развивается и дифференцируется (рис. 1).

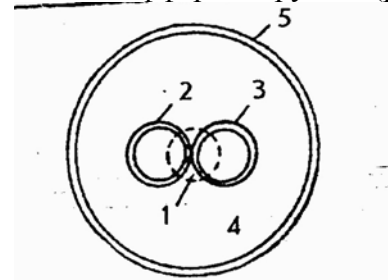


Рис. 1. Эмбрион млекопитающего на ранней стадии развития: 1 - зародышевый диск, 2 - эктодерма, 3 - эндодерма, 4 - первичная мезодерма, 5 - трофобласт.

Зародышевый диск включает эктодерму, эндодерму и мезодерму, из которых впоследствии образуются все ткани микроорганизма. Но как только какую-либо ткань перевести в культуру, то наступает дедифференциация клеток и различить их становится делом трудным или невозможным, и поэтому регистрацию их ведут почти

исключительно по происхождению. Например, для исследования в области онкологии важны культуры раковых клеток, о которых имеются сообщения в научной литературе. Такие клетки получены от больных раком легкого и щитовидной железы. В 1986 г в Японии впервые получен в культуре штамм клеток рака желчного пузыря. Он был стабилен после 103 пассажей *in vitro*, сохранил прежнее число хромосом в пределах 76-101. Индуцируемый им опухолевый процесс и афвичный рак желчного пузыря оказались тождественными по гистограмме. Подобный штамм оказался полезным при оценке противоопухолевых средств.

Любой штамм, представляющий ценность для научно-практического использования, должен иметь следующие характеристики:

- 1) качество исходной ткани – нормальная или опухолевая (доброкачественная и злокачественная);
- 2) тип ткани – эмбриональная или зрелая;
- 3) принадлежности ткани – вид животного;

- 4) источник ткани – орган;
- 5) тип клетки (если известно);
- 6) наименование штамма (буквенное – не более 4 букв и серия цифр нумерации);
- 7) номер клона, если штамм клонировался;
- 8) источник информации (ссылка на публикацию).

Выращиваемые клетки (ИКЧЖ) могут быть отнесены к двум типам:

1. Интактные, вирусонетрансформированные.
2. Вирусотрансформированные клетки.

Успех культивирования первых во многом обусловлен наличием адгезинов, благодаря которым они проявляют эффект «заякоривания» на подлежащей поверхности стекла, металла или пластика рост клеток происходит в виде монослоя. Однако они не растут в суспензионных культурах.

Вирусотрансформированные клетки животных, напротив, хорошо растут в виде суспензионных культур и хуже или совсем не растут в адгезированном состоянии.

Имеются такие штаммы животных клеток, которые могут расти и в прикрепленном состоянии, и в виде суспензии. Прикрепившиеся клетки размножаются, растут и развиваются до тех пор, пока не сольются в монослой, то есть плотность клеток выступает тормозным сигналом. Однако при смене питательной среды на новые порции наблюдается дальнейшее разрастание клеток в форме нескольких слившихся слоев. Подобного результата можно добиться при использовании других факторов воздействия на клеточные культуры (гормоны, ферменты, рН и т. д.). Тем не менее, на практике широко пользуются монослойными культурами.

В настоящее время появилась еще одна группа культур тканей – речь идет о клетках, полученных методами генной инженерии или другим методом современной биотехнологии и требующих специальных условий культивирования.

Для получения первичных трипсинизированных культур (интактные вирусонетрансформированные культуры), удобнее всего использовать эмбриональные ткани – кожно-мышечную, легочную и др. Эмбриональные клетки обладают выраженной пролиферативной активностью вне организма и характеризуются стабильностью генома (табл. 1).

Таблица 1
Митотическая активность (в %) клеток различных первично трипсинизированных культур тканей

Культура	Срок культивирования, ч		
	24	48	72
Фибробласты эмбрионов мышей линии BALB/c	13,0±1,2	28,9±2,0	21,2±0,6
Фибробласты эмбрионов крыс линии Wistar	15,0±1,1	28,3±3,0	26,7±1,9
Фибробласты эмбриона человека	11,0±1,0	30,4±2,5	27,0±3,0
Фибробласты эмбриона хомяка	12,5±0,2	12,0±1,3	11,0±1,7
Фибробласты эмбриона крупного рогатого скота	33,0±1,0	23,8±0,4	14,0±0,3
Фибробласты эмбриона кошки	17,9±3,9	26,7±4,7	27,5±9,7
Почка эмбриона человека	9,4±0,9	19,4±2,3	16,4±1,9
Почка эмбриона хомяка	5,0±0,5	9,0±1,0	6,5±0,1
Почка эмбриона крупного рогатого скота	14,0±0,8	12,0±1,0	12,4±1,8

Молекула фибронектина состоит из 2-х субъединиц с 250 кДа, содержащих небольшие домены и соединенных s-s-мостиками. Каждый домен состоит от 2145 до 2445 остатков α-кислот. Каждый домен отвечает за одну функцию фибронектина (соединение с фиброном, другой домен – за прикрепление к подложке, к пластику).

2. СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

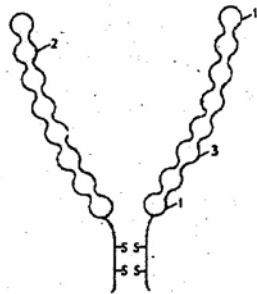


Рис. 2. Схематическое изображение молекулы фибронектина с доменами, обеспечивающими связь с фибрином (1), с коллагеном (2), с клеткой (3)

Фибринектин – это амфотерный гликопротеин стимулирующий адгезию, в качестве связывающих мостиков можно применять ионы Ca и Mg.

В прикрепляемости клеток большое значение имеют характеристики субстрата: гидрофильность его поверхности (смачиваемость), протяженность и горизонтальность. Распластываемость клеток на подложке будет выше, если число отрицательных зарядов оказывается не ниже 5 на площади 10 нм^2 клетки. Хорошо культивируются на стекле, алюминии, резине, полистерине, тефлоне и т.п.

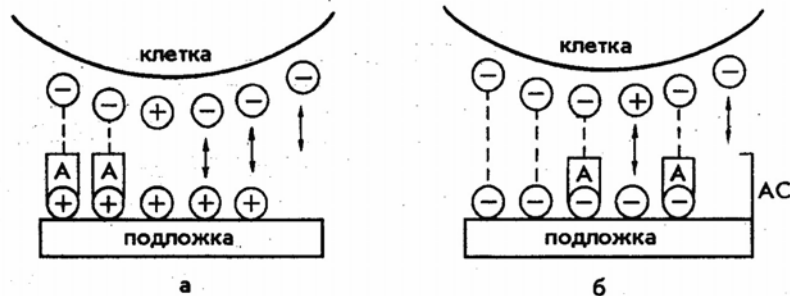


Рис. 3. Механизм адгезии животной клетки к субстрату, несущему положительные (могут и отрицательные) заряды. А – адгезин, стрелки – электростатические взаимодействия, пунктиры – связанные при участии двухвалентных катионов. АС – адсорбционный слой толщиной 5 нм

Системы культивирования животных клеток и тканей делят на 2 группы: 1 группа – монослойные, когда клетки развиваются на поверхности стекла и пластика (бутылок, матриц) или поверхности специальных носителей, погруженных в питательной среде. Культура клеток выращивается в виде монослоя, в виде однослойной стационарной культуры. 2-я группа – суспензионные культуры, когда клетки растут свободно (подобно микроорганизмам) в суспензии.

Для крупномасштабного получения суспензионных культур необходима промышленная аппаратура, соответствующая двум главным требованиям: конструкция должна быть рациональной, обеспечивающей интенсивное перемешивание среды; кроме того, клетки должны находиться в щадящих условиях. Не всегда легко соблюсти оба требования.

Для управляемого реактора культивирование клеток (по данным Института биофизики АН СССР, 1985 г) наиболее удобным является суспензионный метод. Данный метод требует наиболее однородного условия для культивирования тканей, близких к тем, которые создаются при выращивании микроорганизмов.

Используя культивирование клеток в суспензии, можно получить большой выход клеток на единицу объема среды при обильной подаче питательных веществ. Однако к такому типу культивирования удовлетворительно адаптируются не все клетки, а лишь трансформированные, такие как HeLa, кВ, ВИК-21 и др., а также лейкоцитарные культуры.

Для культивирования животных клеток используют те же технические средства, которые применяют для культивирования микроорганизмов. Однако в этих случаях доби-

ваются того, чтобы в биореакторах не происходили механические повреждения животных клеток, которые менее прочны, чем микроорганизмы. Внутренняя поверхность реактора должна быть гладкая, а механические мешалки не должны создавать сильную турбулентность среды. Большинство клеток требует поверхности для своего роста.

Чтобы повысить концентрацию клеток в биореакторе, практикуют отделение клеток от среды при помощи мембран. Необходимо учитывать, что размеры животных клеток составляют примерно 5-10 мкм (размеры большей части бактерий около 0,5×3 мкм).

Чтобы интенсифицировать процесс получения продуктов с использованием клеток животных, необходимо создать биореакторы, в которых можно было бы повысить концентрацию клеток на два порядка. Для этого практикуется адсорбция клеток к поверхности полых волокон или флокуляция при помощи специальных флокулянтов. Наиболее широко применяются для культивирования животных клеток шарообразные микроносители из стекла, синтетических полимеров или декстрана с частицами размеров 200-500 мкм.

Для крупномасштабного культивирования клеток используют роллерное культивирование: выращивание клеток производят на стенке цилиндрических вращающихся сосудов в виде монослоя в роллерно-бутылочных аппаратах, помещенных в термостатируемые камеры. Такие аппараты широко используются в производстве вакцин, число бутылок в каждой установке достигает 700, объем сотни литров.

Роллерные культуры просты, надежны, экономичны. При выращивании клеток центральной проблемой остается повышение эффективности использования компонентов среды, продуктивность клеток, увеличения доступной для роста клеток поверхности в расчете на единицу объема питательной среды.

Роллерные культуры имеют значительные преимущества по сравнению со стационарными при том же количестве питательной среды. Площадь, занимаемая клетками, по крайней мере, в 10 раз больше. Сконструированы специальные культиваторы, в которых развернута поверхность роста находится в подвижном состоянии, что обеспечивает вращение культур.

Отдельным подходом в культивировании клеток является выращивание клеток на носителях, в качестве которых используют стеклянные трубки, шарики, гранулы сефадекса, пластиковые зерна, спирали и др. Созданы аппараты, в которых площадь роста увеличивается за счет неподвижно расположенных сфер диаметром 3-10 мм или коротких сегментов трубок, горизонтально расположенных пластин, полупроницаемых клеток. Оптимальные условия для роста клеток создаются путем перфузии среды между элементами посадки.

Способ культивирования клеток на микроносителях является оптимальной комбинацией: с помощью технологии суспензионных культур выращиваются поверхностно-зависимые клетки. Центральной проблемой является подбор материала носителя: используются различные пластикаты, металлы, стекла. Для управления процессом необходимо исследование кинетики роста клеток на микроносителях и анализ гидродинамической обстановки.

Таким образом, современный этап характеризуется развитием эффективных крупномасштабных систем культивирования клеток человека и животных, производства аппаратуры – культиваторов, а также самих клеток, питательных сред, широким внедрением асептических методов работы, использованием кинетических схем контроля основных характеристик, в том числе антигенности культивируемых клеток.

Проблема обеспечения оптимальных условий культивирования клеток человека и животных вне организма ещё далека от решения.

Создание способа крупномасштабного культивирования клеток вне организма открыло возможность в получении медикаментов, клеточных метаболитов и других ценных веществ с заданными свойствами.

3. КРУПНОМАСШТАБНОЕ ВЫРАЩИВАНИЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

При культивировании учитываются разные параметры. Это константные параметры – качество материала, форма и объем культуры. Это переменные параметры – скорость вращения или покачивания, качество и объем среды, тип клеток и размер посевного материала, pH, t, O₂, CO₂, окислительно-восстановительный потенциал и концентрация основных источников питания среды.

Для ККЧЖ используются естественные среды:

- 1) коагулянты – сгусток плазмы;
- 2) биологические жидкости – сыворотка, амниотическая, асцитическая жидкость и др.;
- 3) тканевые экстракты, например, эмбриональный экстракт.

Широко применяется в промышленности ряд синтетических сред, в основе которых имеется смесь неорганических солей – физиологический или сбалансированный солевой раствор. Функция этого раствора заключается в сохранении pH и осмотического давления среды, а также в обеспечении биологического агента необходимыми неорганическими веществами. Все среды содержат низкомолекулярные вещества, причем, число ингредиентов превышает 50, в их числе глюкоза, необходимые аминокислоты, витамины и др.

Наиболее широко применяемыми синтетическими средами являются среда 199, среда Игла, ВМЕ, среда Маккоя, среда RPM1, среда Финкера и др.

В некоторых случаях к синтетическим средам добавляют биологические жидкости: сыворотка, тканевые экстракты и др. Они обеспечивают клетки гормонами (кортикоиды, инсулин, половые гормоны, простогландины и др.), ростовыми факторами (эпидермальным, фибробластным, Т-клеточным, тромбоцитарным, опухоленекротическим и др.), факторами адгезии (коллаген, фибриноектин, ламинин – из мышинной саркомы), белками (альбумин, трансферрин, фетуин 0,2% N-ацетилнейраминовой кислоты), микроэлементами, липидами, и другими БАВ для выращивания *in vitro*. Обычно используется фетальную бычью сыворотку (ФБС), а также сыворотки фирмы «Sigma» (США). Некоторые из них по качеству (для отдельных линий клеток) превосходят ФБС, например, сыворотка крови новорожденных телят в возрасте до 10 дней и менее, менее 10-месячного возраста, а также лошадиная сыворотка от жеребцов, кастрированных за год до взятия крови.

Вместо натуральных сывороток фирма IBF biotechnics (Германия) предлагает высококачественные заменители, в частности, ultroser G – для иммобилизованных клеток. Эта среда содержит мало белка, благодаря чему упрощается очистка биопродукта и достигается стабильность компонентного состава.

Оптимальные показатели pH и температуры зависят от происхождения и качества клеточных линий. Так, для клеток млекопитающих концентрацию водородных ионов поддерживают в пределах pH от 7,2 до 7,4, а температуру – в пределах +36 - +37,5°C. Поддержание pH осуществляют обычно за счет буферных систем [(CO₂ – NaHCO₃) трис- и др.], а температуру – с помощью терморегуляторов.

Контроль за развитием клеток проводят с помощью прямых (подсчет) и непрямых методов (по мутности, по подсчету ядер, по определению общего белка).

Посевной материал (от лат. Inoculation - прививание) заметно сказывается на скорости роста клеток в монослойной культуре. В случае применения первичных клеток необходимо использовать посевной материал более высокой плотности на 1 см³ внутренней (рабочей) поверхности культиватора.

Если же используют клеточные линии (а не первичные клетки), то плотность инокулята может быть несколько меньшей, так как почти все 10% адгезируются на поверхности культиватора. Покачивание или вращение омываемых средой клеток несомненно сказывается на их прикреплении.

Выбор клеток не столь велик, но некоторые из них вполне адаптированы к условиям выращивания *in vitro*. В 1964 г. впервые были получены линии соединительно-тканых клеток - фибробластов ВНК 21 от сирийского хомяка. Эти клетки пассируются неограниченно долго и первоначально использовались для репродукции вируса ящура для приготовления соответствующих вакцин.

Используют клетки почек кроликов, обезьян, собак, 10-14-дневных куриных эмбрионов, клетки из миндалин, [аминона](#), легких эмбриона человека 12-16-недельного возраста, клетки эпидермиса взрослого человека, мышечные фибробласты и др. нормальные диплоидные клетки человека могут делиться ограниченное число раз (50±10) и проявляют феномен старения. В то же время такие клетки как HeLa, выделенные из раковой опухоли шейки матки человека, оказывались бессмертными при пассировании.

Клетки выращивают в строго асептических условиях в специальном оборудовании при медленном вращении роллерной системы и покачивании для омывания большей площади культуральной среды. Клетки погружаются то в

жидкую фазу, то в газообразную, для обеспечения дыхательной потребности в O₂.

3.1. Глубинное выращивание клеток человека и животных в монослое

При глубинном культивировании клеток применяют следующие условия pH 7,2 – 7,4, t 36-37,5°C. Контроль за развитием клеток проводят с помощью прямых (подсчет) и непрямых методов (по мутности, по определению общего белка).

Посевной материал (инокулят, от латинского inoculatio – прививание), его качество сказывается на скорости роста клеток. Рассмотрим в качестве примера технологии культивирования клеток человека и животных – получение вирусной вакцины Солка (против полиомиелита) из тканевой культуры почек обезьяны. Ткань коркового слоя свежих почек измельчают и суспендируют в среде №199, затем многократно обрабатывают по 20 мин 0,5%-ным [раствором трипсина](#) при pH среды 7,6, чтобы ферментативно гидролизовать ткани и разделить клетки. Суспензию центрифугируют и клетки суспендируют в той же среде с добавлением плазмы телячьей крови или гидролизата лактоальбумина. Суспензию клеток инкубируют 5 суток в особых сосудах, где за это время на их стенках образуется однослойная пленка клеток.

Когда клетки вырастут, жидкую фракцию сливают, клетки промывают изотоническим раствором поваренной соли, добавляют свежую среду и засевают её соответствующим вирусом полиомиелита. После 3-суточного инкубирования клетки полностью разрушаются, и вирусы переходят в раствор. Остатки клеток удаляют центрифугированием, и оставшийся раствор используют для вакцинации. Для сохранения вакцину замораживают.

3.2. Глубинное выращивание клеток в суспензионных культурах

Главное отличие – использование микроносителей, которые увеличивают площадь выращенных клеток. Микроносители суспендируются в питательной среде и на их поверхности закрепляются клетки, а затем разрастаются в виде монослоя. Данный метод представляет собой усовершенствованный вариант глубинного выращивания клеток человека и животных в монослое.

В качестве микроносителей применяют положительно заряженные ДЕАЕ – сефадексы, сефадексы с коллагеновым покрытием, отрицательно заряженный полистирол, полые стеклянные сферы, микросферы из пористого шлачного стекла. Поры их доступны для пенетрации (лат. Penetratio – проникновение) клеток внутрь матрикса. Пористые сферы пригодны для иммобилизации прилипающих и суспензионных клеток (например, гибридом).

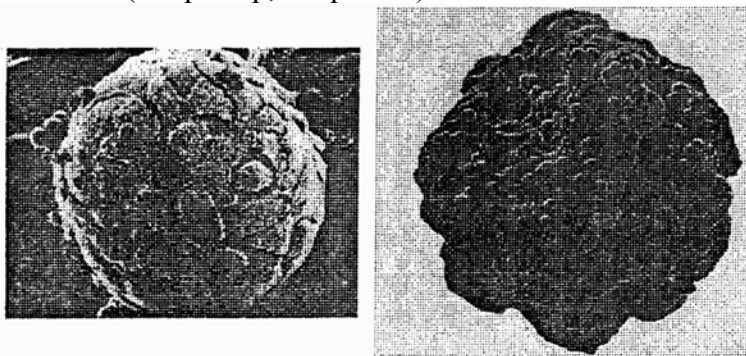


Рис. 4. Микросферы для иммобилизации клеток млекопитающих из микропористых, биологически инертных стекла (а) и стеклошлака (так называемого Cultispher-G) (б) увеличение $\times 10\,000$

Рекомендуемый размер носителей - 200 ± 25 мкм. Требуемое количество их равно 10^4 /мл, а для инокуляции необ-

ходимо порядка 10^5 клеток. При увеличении количества микроносителя возрастает доза клеток в инокуляте.

Выбор сред и параметры остаются прежними (разд. 2). Клетки после выращивания отделяют от микроносителей центрифугированием (в том числе в градиенте плотности), фильтрованием или, чаще, обработкой трипсином с последующим промыванием и сепарированием.

Полученные клетки применяют в целях получения вирусных вакцин (против бешенства, полиомиелита, ящура).

При культивировании клеток в среду добавляют белки сыворотки крови, которые играют роль защитной матрицы – животные клетки имеют высокую ранимость по сравнению с микробными и растительными клетками. Тем не менее, основные подходы к выбору оборудования и к реализации биотехнологических процессов животных клеток во многом аналогичны микробной биотехнологии. Например, система культивирования одинакова: хемо- или турбидистатные, периодические (циклические), непрерывные и полунепрерывные.

3.3. Глубинное выращивание клеток животных в инкапсулированном состоянии

В противоположность суспензионным культурам клеток на микроносителях разрабатываются способы инкапсулирования их в полимерные среды (полилизинные, агарозные, изополимерные слои). В этом случае клетки не испытывают большого механического напряжения, которые они должны использовать в свободном виде.

Способ инкапсулирования оказался выгодным для культивирования гибридом в целях получения моноклональных антител. Диаметр микрокапсул, размер пор в них и их толщина могут быть независимо проконтролированы в процессе изготовления и оптимизирования для конкретного

типа гибридом. Для этого разработана спецтехнология. Гибридомные клетки суспензируют и биосовместимом растворе натрия альгината. Образовавшиеся капельки затем пропускают в раствор кальция хлорида (CaCl_2), где они становятся желированными микросферами. На поверхности таких сред затем формируют полилизиную мембрану. После этого гель разжижают, оставляя гибридомные клетки в нормальном физиологическом состоянии внутри «дырчатых» микросфер. При культивировании инкапсулированных гибридом продукция моноклональных антител возрастает в тысячи раз по сравнению с обычным культивированием гибридомных клеток. После завершения биосинтеза антител микрокапсулы подвергают диализу для удаления примесей веществ, а затем физически их «раскрывают», гибридомные клетки и фрагменты капсул легко сепарируются от искомым моноклональных антител, которые могут быть подвергнуты дополнительной очистке или использованию по назначению (рис. 5).

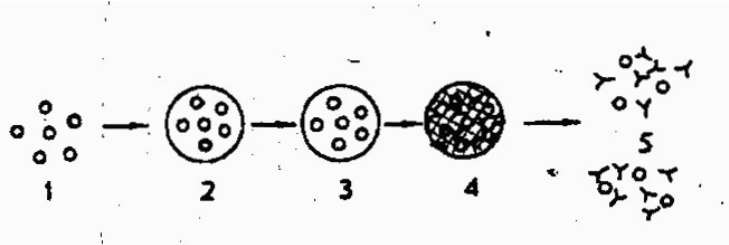


Рис. 5. Получение моноклональных антител с помощью инкапсулированных клеток гибридомы (схема): 1 – клетки гибридомы; 2 - клетки гибридомы в растворе натрия альгината; 3 – клетки гибридомы в ээ растворе кальция хлорида; 4 – клетки гибридомы в «дырчатых» микросферах; 5 – антитела и клетки-гибридомы после разрушения полилизиновой мембраны

Полилизинная мембрана обеспечивает диффузию небольших молекул питательных веществ внутрь микросфер, но не позволяет диффузию иммунным глобулинам. Кроме

физического удаления полилизинной мембраны можно использовать ферментативный гидролиз.

В описанные микросферы возможно инкапсулировать не только клетки, но и ферменты, индукторы каких-либо процессов, а также мультисистем.

Таким образом, глубинное выращивание животных клеток реализуют в трех вариантах:

1. монослой клеток статичен, культуральная фаза подвижна;
2. среда культивирования статична, монослой клеток подвижен;
3. клетки (например, на микроносителе в микросферах) и среда культивирования подвижна.

Эти варианты надо иметь в виду при выборе технологии и проектировании оборудования.

В опытно-промышленных условиях получают интерферон, выращивая микробласты человека в виде отъемно-доливных культур, т.е. когда определенная часть клеточной суспензии замещается свежей средой, например, ultroser НУ (Германия), а оставшаяся часть «старой» культуры выполняет роль инокулята.

Неопределенно длительное время можно выращивать клетки млекопитающих в непрерывных хемостатных культурах. В хемостатах скорость подачи свежей среды и отбора культуры равны (как и объем их). Скорость роста клеток контролируется скоростью подвода лимитирующего компонента, а численность – его концентрацией. В качестве лимитирующего рост агента чаще всего используют глюкозу, реже – фосфаты и другие вещества. В хемостатах удается на порядок увеличить выход клеток по сравнению с периодическим культивированием. Причем, хемостатные культуры отличаются накоплением физиологически однотипных клеток. Это можно показать на примере с клетками лейкемии мышей - L 1210 (таблица 2), которые заседали

(инокулят) в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/мл для периодического культивирования, длившегося 3 суток до получения максимальной плотности $2,5 \cdot 10^6$ клеток/мл (суспензионные культуры). При хеостатном культивировании скорость подачи среды и отъема культуры составляла $0,3 \text{ сут}^{-1}$.

Таблица 2

Накопление клеток L 1210 при периодическом и непрерывном культивировании (по М.Ж. Тови, 1985)

Способ выращивания	Объем среды, л	Урожайность клеток			
		на 1 мг глюкозы		на 1 мл среды	в неделю
		$\times 10^6$	мкг	$\times 10^6$	
Периодический	0,3	3,5	524	2,3	$1,38 \cdot 10^9$
Непрерывный (хеостатный)	0,3	6,2	601	6,2	$1,12 \cdot 10^{10}$

Естественно, что время, затрачиваемое на подготовку смежных циклов и их реализацию при периодическом культивировании, является непроизводительным.

4. ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И ДРУГИЕ ТКАНИ ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСОВ И ПОЛУЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Из эмбриональных тканей наиболее широко используются эмбриональные ткани цыпленка, мыши и человека. Особенной выгодой отличаются куриные эмбрионы (по доступности) 10-12-суточного возраста. Они используются для репродукции вирусов и изготовления вирусных вакцин, а также антигенных препаратов еще с 1931 г.

Инкубированные при 38°C куриные яйца овоскопируют (просвечивают), отбраковывают «прозрачные», неоплодотворенные экземпляры и сохраняют оплодотворенные – у них хорошо видны кровеносные сосуды и движение эмбрионов.

Заражение эмбрионов проводят вручную или автоматически. Последний способ применяют в крупномасштабном производстве противогриппозных вакцин и др. Материал, создающий вирусы, вводят с помощью шприца (батареи шприцов) в различные части эмбриона (рис. 6) в асептических условиях.

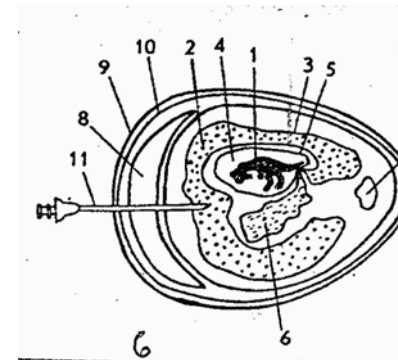


Рис. 6. Структурные части десятидневного куриного эмбриона: 1 – плод, 2 – аллантоисная полость, 3 – хорионаллантоисная оболочка, 4 – полость амниона, 5 – оболочка амниона, 6 – желточный мешок, 7 – белочный мешок, 8 – воздушное пространство, 9 – скорлупа, 10 – скорлупная оболочка, 11 – введение вирусного материала в аллантоисную полость

Материалом для заражения может быть суспензия растертой мозговой ткани (для вируса бешенства), печени, селезенки, почек (применительно к хламидиям орнитоза и т.д.). В целях предотвращения бактериального загрязнения применяют антибиотики (пенициллин), грибкового загрязнения – нистатин и др. полиены.

Чаще всего, суспензию вирусного материала вводят в аллантоисную полость или реже на хорионаллантоисную оболочку в количестве $0,05-0,1$ мл, прокалывая продезинфицированную скорлупу (йодированным этанолом) на расчетную глубину.

Отверстие закрывают расплавленным парафином и эмбрионы помещают в термостат при температуре $36-37,5^\circ\text{C}$. Продолжительность инкубации зависит от типа и активности вируса. Через 2-4 суток наблюдается изменение оболочек с последующей гибелью эмбрионов. Зараженные эмбрионы контролируют ежедневно 1-2 раза (овосколируют).

ют, поворачивают другой стороной). Погибшие эмбрионы затем передают в отделение сбора вирусного материала. Там аллантоисную жидкость с вирусом отсасывают и переносят в стерильные емкости. Инактивацию вирусов при определенной температуре проводят обычно с помощью формалина, фенола или других веществ. Применяя высокоскоростное центрифугирование или аффинную хроматографию, удастся получить высокоочищенные вирусные частицы.

Собранный вирусный материал подвергают контролю и лиофильной сушке. Контролю подлежат следующие показатели: стерильность, безвредность и специфическая активность. Вирусный материал должен отвечать ряду требований, прежде всего, - отсутствие живого вируса в убитой вакцине. Безвредность и специфическую активность оценивают на животных, и только после этого вакцину разрешают испытывать на волонтерах или добровольцах. После успешного проведения клинической апробации вакцину разрешают применять в широкой медицинской практике.

Из прочих эмбриональных тканей используют эмбрионы мышей или других млекопитающих животных, а также абортированные плоды человека.

Эмбриональные перевиваемые ткани доступны после обработки трипсином, поскольку в таких тканях еще не формируется большого количества межклеточного вещества (в том числе небелковой природы). Клетки разделяются, и после необходимых обработок их культивируют в специальных средах в монослое или в суспензированном состоянии.

Ткани, изолируемые от животных после рождения, относятся к разряду зрелых. Чем их возраст больше, тем с большим трудом они культивируются. Однако, после успешного выращивания, они «выравниваются» и мало чем отличаются от эмбриональных клеток.

В целях репродукции вируса особую роль сыграли почечные и алланто-зрелые ткани. Из них первые получали от обезьян, вторые – из амниотических оболочек женщин-рожениц при нормальных родах. Свежие почки от здоровых обезьян, например, макаки-резус или африканских зеленых мартышек, сразу же после экстирпации (от лат. *extirpatio* – полное вырезание, вылушение) декапсилируют, рассекают пополам, удаляют лоханки, нарезают паренхиматозную ткань на мелкие кусочки, трипсинируют (обрабатывают протеолитическим ферментом трипсином), и клетки (порядка $3 \cdot 10^3$ мл) помещают в специальную среду, термостатируют при 45°C в качающихся аппаратах. Спустя сутки, культуру заражают, например, вирусом полиомиелита, через 4-7 дней в надсадочной жидкости накапливается вирус, на основе которого получают вакцину (Цыренов, 2004).

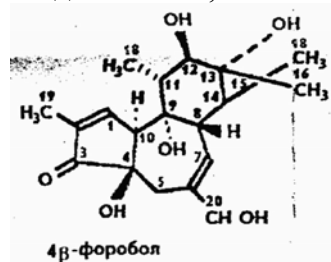
По способам культивирования особое место занимает вирус бешенства. Его репродукцию осуществляют на мозговой ткани целостных организмов, используя для этого кроликов, крыс, овец.

Л. Пастер в 80-е годы XIX века выделил от больной собаки вирус бешенства, и после ряда пассажей через мозг кроликов он добился того, что вирус приобрел свойства вызывать заболевание у данных животных после определенного и постоянного инкубационного периода (4-6 дней). Такой вирус, в отличие от вируса «уличного» бешенства, получил название *Virus fixe* (фиксированный вирус). Его-то и применяют для получения вакцин.

Перевиваемые опухоли животных, в частности, асцитные, нашли широкое применение на практике. Они хорошо растут в форме суспензии изолированных клеток в экссудате брюшной полости мышей и крыс. Опухолевые размножаются в асцитной жидкости, которую отсасывают из брюшной полости с помощью шприца (или с помощью пи-

петки после оперативного вмешательства). Такие клетки можно также выращивать *in vitro*.

Перевиваемые опухоли животных представляют определенную ценность при изучения противоопухолевых химиотерапевтических веществ. Для выращивания опухолевых клеток могут оказаться полезными так называемые *кокарциногены* - вещества, индуцирующие формирование опухолевой ткани, хотя сами не являются карциногенами. Среди известных кокарциногенов наиболее сильным триггерным действием (от англ. trigger - спусковой крючок, «собачка») обладает *тиглиян* - природный вторичный метаболит у растений, относящихся к семействам Euphorbiaceae (молочайные) и Thymelaeaceae (тимиановые). Он является природным фороболом из группы тетрациклических дитерпенов с пергидро-циклопропа- бензазуленовым скелетом. В этом скелете содержится 7 хиральных атомов углерода, и, следовательно, возможно существование большого числа



изомеров. Из всех фороболов только производные 4β - форобола являются активными, но не производные 4α стереоизомеров. Предполагают, что их деградация происходит замедленно и поэтому они могут непрерывно

активировать фермент протеинкиназу C. Это, в свою очередь, стимулирует специфические протеазы, катализирующие реакцию распада фермента с последующим серьезным нарушением клеточной регуляции, сопровождающейся индукцией опухолевого роста.

Необходимо также помнить, что фороболы еще стимулируют клеточную пролиферацию, митогенез лимфоцитов, продукцию простагландинов, дегрануляцию нейтрофилов, синтез ДНК, изменения в свойствах мембран и др. Однако, в связи с высокой биологической активностью, эфиры

форобола представляют определенную опасность для здоровья работающих с ними лиц. Поэтому операторы должны надевать перчатки, защитные очки и прочую одежду, чтобы защитить кожу и глаза от контакта с этими веществами.

Для инактивации эфиров форобола их необходимо растворить в органическом растворителе, смешивающемся с водой, в равном объеме 10%-ного водного раствора натрия гидроксида. Гидролиз эфиров завершается в срок до одного часа выдержки, после чего щелочной раствор становится безопасным.

Водные растворы эфиров форобола могут быть обезврежены добавлением около 10 % по объему натрия гипохлорита.

Способствует росту опухолевых клеток (-)-индолактам, являющийся производным индола. Его эффективность в других биологических системах различна, что может быть объяснено различным аффинитетом к C-подтипам протеинкиназы; стереоизомер (+)-индолактам не обладает стимулирующим действием, но его можно использовать в качестве субстанции для негативного контроля.

В таком же плане могут быть использованы новые, человеческого происхождения, гормоноподобные ростовые факторы: инсулино-подобные (IGF 1 и 2), тромбоцитарные (PDGF, от англ. Platelet Derived-Growth-Factors), трансформирующие ростовые (TGF α и P), некроза опухолей (TNF α).

IGF I - полипептид, состоящий из 70 аминокислотных остатков, спирально закрученный и удерживаемый в таком состоянии благодаря трем S-S — мостикам между остатками цистеина (рис. 7). Первый из них соединяет дисульфидной связью 6-й и 48-й остатки, второй - 18-й и 61 -и остатки, третий - 47-й и 52-й остатки. IGF 1 является пептидным гормоном, влияющим на рост и обмен веществ организма

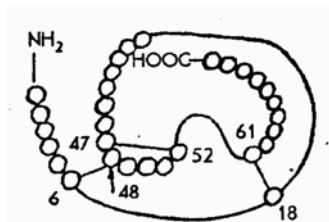


Рис. 7. Полипептид IGF-1 (схема)

последней стадии и эпителиальные клетки млекопитающих, крысиные миобласты, олигодендроциты, клетки черепа и клетки зубной железы; человеческие хондроциты и адренергические нейробластные клетки. Вариантом IGF 1 является укороченный на N-терминальный трипептид-мозговой IGF, изолированный из мозга плода и взрослого человека. Этот пептидный гормон важен для роста и метаболизма центральной нервной системы. Он в 4 раза сильнее IGF 1 по стимуляции синтеза ДНК в фетальных мозговых клетках крыс и более выражено реагирует в перекрестных реакциях с рецепторами для IGF 1 на мембранах мозга у плода и взрослого человека.

IGF 2 - полипептид, (состоящий из 67 аминокислот (MM-7470). Как и IGF 1 является сильным митогеном для многих клеток. Как полагают, он - важный регулятор роста соматических клеток, стимулирующий их размножение.

Тромбоцитарный ростовой фактор PDGF - гомодимерный, мультфункциональный полипептид, который действует как сильный митоген в отношении широкого набора эндотелиальных клеток фибробластов. Его рассматривают как вещество, играющее важную роль в восстановлении тканей и воспалении. PDGF - хемоаттрактант для фибробластов, гладкомышечных клеток, моноцитов и нейтрофилов, что играет немаловажную роль в заживлении ран.

В отвечающих на PDGF клетках индуцируются оборот фосфатидилинозита, метаболизм простагландинов и акти-

после рождения. Его секреция находится под влиянием уровня гормонов роста в сыворотке крови и характера питания ребенка. IGF 1 влияет на рост и дифференциацию многих типов животных клеток, включая мышечные клетки - предшественники эритроцитов

вируются фосфолипазы. В человеческих фибробластах кожи, стимулированных PDGF, возрастает в три раза коллагеназная активность. Полагают, что он принимает участие в трансформации клеток и вовлекается в процесс атеросклероза.

5. ПОЛУЧЕНИЕ ИНСЕКТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Культуры клеток и тканей насекомых приобрели большое значение в различных биологических науках (эндокринологии, биохимии, вирусологии и др.) и в биотехнологии.

Это стало возможным благодаря разработкам соответствующих сред, на которых хорошо развиваются указанные биообъекты, а на объектах, в свою очередь, можно с успехом поддерживать рост соответствующих патогенов, поражающих растения, животных и человека (членистоногие паразиты и вирусы). Более того, на культурах клеток и тканей насекомых можно обеспечить продукцию вирулентных инсектовирюсов и рекомбинантных белков, используя вирусы насекомых в качестве векторов. Велика роль таких культур в процессе контроля за чумой.

Прогресс в получении клеточных линий насекомых был последовательно обеспечен трудами В. Трагера в конце 30-х годов текущего столетия, С. Вьятта (1956), Т. Д. С. Грейса (1962). Грейс модифицировал среду Вьятта, включившую 21 аминокислоту, пять солей, три сахара, три органические кислоты (рН = 6,3 - 6,5), добавив в нее 9 витаминов комплекса В. В результате ему удалось изолировать 4 культуры, ставшие стабильными линиями клеток насекомых. В последующие годы были получены самые различные клеточные линии от насекомых, относящихся к различным порядкам, но с преобладанием Diptera (мухи, комары)

и Lepidoptera - бабочки (от греч. di(s) - два, дважды, двух; pteron - крылышко; lepis - чешуя). Для них наиболее часто используют среды Дж. Митсухаси и К. Марамороша (среда MM), Шилда и Санга (среда M3), Шнейдера; Эхальера и Оганесяна (среда D-22), IPL-41 и другие. Фирма Sigma (США) выпускает указанные среды в сухом виде. Технология выращивания вирусов на культурах клеток насекомых принципиально мало чем отличается от выращивания других вирусов на клетках животных и человека.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ПОНЯТИЯ

Адаптация - приспособление наследственно компетентной клетки организма к изменявшимся условиям существования.

Адвентивный - развитие необычных точек происхождения, например, почечные или корневые ткани, возникающие из каллуса, или зародыша, развивающиеся из других источников, а не из зигот. Этот термин также может быть использован для описания агентов загрязняющих клеточные культуры

Аксеническая культура - культура без чужеродных или нежелательных форм жизни, аксеническая культура может включать запланированное сокультивирование различных типов клеток тканей или организмов.

Амплификация - увеличение числа копий нужного гена.

Аллельные гены – гены, расположенные в одних и тех же участках гомологичных хромосом. Контролируют развитие альтернативных признаков (доминантных и рецессивных).

Андрогенез - процесс развития растения из микроспоры или пыльцевого зерна, либо через гаметический эмбриогенез или из каллуса.

Анеуплоид – организм, клетка, ядро с числом хромосом, отклоняющимся от x и от чисел кратных x хромосомы могут/не могут перестраиваться.

Апекс – верхушка.

Апикальная (верхушечная) культура почечная - структура, состоящая из почечной апикальной меристемы, с одним - до нескольких примордиальных листьев и обычными размерами от 0,1 до 1 мм в длину, если включаются более зрелые листья, то такая группа может достигать в длину нескольких сантиметров.

Апикальная меристема почечная - недифференцированная ткань локализованная в виде блестящей куполоподобной структуры, дистальной к самому молодому листовому примордию и размером менее чем 0,1 мм в длину при вырезании.

Апикальное доминирование - подавление роста боковых почек растительного побега или наличие терминальной почки.

Асептические процедуры (методы техника работы) - процедуры, обеспечивающие предотвращение попадания микробов в клетки, ткани и органы растительных культур, и (или) перекре-

стное загрязнение одной клеточной культуры другой. Эти процедуры могут/не могут исключить занесение инфицирующих молекул.

Асептическое состояние - состояние без инфекции или микробов-контаминантов.

Бессмертие - приобретение ограниченной во времени клеточной культурой признаков непрерывной клеточной линии. Бессмертная клетка не обязательно та, которая неопластически или злокачественно трансформируется.

Вариант – культура, проявляющая стабильное фенотипическое изменение - генетическое или эпигенетическое по природе.

Вариационный ряд - ряд модификационной изменчивости признака, слагающийся из отдельных вариантов, расположенных в порядке увеличения или уменьшения количественного выражения признака (размеры листьев, число цветков в колоске, изменение окраски шерсти и т. п.).

Вегетативный рост - воспроизведение растений, путем использования бесполого процесса (части стебля или листьев).

Вид - совокупность особей одного вида, обладающих наследственным сходством морфологических, физиологических и биохимических особенностей, свободно скрещивающихся и дающих плодовитое потомство, приспособленных к сходным условиям жизни и занимающих в природе определенную область распространения – ареал.

Время генерации клетки - интервал времени между двумя последовательными делениями клетки. Этот интервал может быть лучше определен с помощью кинофотомикрографии (цейт-раферная съемка), этот термин не является синонимом «времени удвоения популяции».

Время удвоения популяции - интервал времени, в течение которого число клеток в популяции возрастает вдвое, другими словами - это интервал соответствующий логарифмической фазе роста, за который, например, число клеток $1 \cdot 10^6$ степени увеличивается до $2 \cdot 10^6$ степени клеток. Этот термин не является синонимом термина «время генерации клетки».

Габитуация - приобретенная способность популяции клеток расти и делиться, независимо от экзогенно добавляемых ростовых факторов.

Гамета - половая клетка растительного или животного организма, несущая один ген из аллельной пары. Гаметы всегда несут гены в «чистом» виде, так как образуются путем мейотического деления клеток и содержат одну из пары гомологичных хромосом.

Гаметоклон – растение, регенерированное из клеточной культуры, произошедшей из мейоспоры гаметы или гаметофита.

Гаметоклональная вариация - вариация в фенотипе, генетическая или эпигенетическая по природе, выраженная гамето-клонами.

Гаплоид – ядро, клетка, организм с половинным набором хромосом.

Генетика популяции - раздел генетики, изучающий генотипический состав популяций. Это позволяет рассчитывать частоту мутантных генов, вероятность встречаемости их в гомо- и гетерозиготном состоянии, а также следить за их накоплением в популяциях мутаций как вредных, так и полезных. Мутации служат материалом для естественного и искусственного отбора.

Геном – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом данной клетки, данного вида организма.

Генотип – совокупность (система) всех наследственных задатков особи, наследственная основа организма, составленная совокупностью генов (геном), а также неядерных - цитоплазматических и пластидных (плазмон) ее носителей. Генотип - сложная взаимодействующая система наследственных задатков данной клетки или организма, включая аллели генов, характер их сцепления в хромосомах и наличие хромосомных перестроек.

Генофонд – совокупность генов популяции в данный период времени.

Гетерозис – мощное развитие гибридов, полученных при скрещивании инбредных (чистых) линий, одна из которых гомозиготна по доминантным, другая - по рецессивным генам.

Гетерокарион – клетка, содержащая два или более генетически различных ядер в общей цитоплазме (обычно является результатом слияния клеток).

Гетероплоид - термин относится к клеточной культуре, в которой клетки обладают ядрами, содержащими другое число хромосом в сравнении с диплоидным числом. Данный термин используют только для описания культуры, а не отдельных клеток. Следовательно, гетероплоидная культура должна быть той культурой, которая содержит анеуплоидные клетки.

Гибридизация - естественное или искусственное скрещивание особей, относящихся к различным линиям, сортам, породам, видам, родам растений и животных.

Гибридная клетка – термин используют для описания монуцелярной клетки, произошедшей из слившихся двух различных клеток с образованием синкариона.

Гиногенез - процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

Гомокарион – клетка, содержащая два или более генетически идентичных ядер в общей цитоплазме (результат слияния клеток).

Гомологичные хромосомы - парные хромосомы, одинаковые по форме, размерам, набору генов. В диплоидной клетке набор хромосом всегда парный: одна хромосома из материнского происхождения, вторая – отцовская.

Дедифференциация - комплекс процессов, в результате которых наступают различия между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Делеция - тип хромосомной перестройки, в результате которой выпадает участок генетического материала. Размер делеции может быть от нескольких нуклеотидных пар до фрагментов, содержащих ряд генов.

Дигибридное скрещивание - скрещивание форм, отличающихся друг от друга по двум парам альтернативных признаков.

Дифференцированные клетки - клетки в культуре, в которых поддерживаются все или многие из специализированных структур и функций, типичные для этих клеток *in vivo*, другими

словами, дифференцировка - состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Доминантный признак - преобладающий признак, проявляющийся в потомстве у гетерозиготных особей.

Изменчивость - способность организмов изменять свои признаки и свойства. Определенная, групповая (модификационная) изменчивость не наследуется. Неопределенная индивидуальная (мутационная) изменчивость наследуется.

Инбредная депрессия - снижение жизнедеятельности и продуктивности у животных и растений, полученных в результате инбридинга.

Инбридинг - «разведение в себе» - близкородственное скрещивание сельскохозяйственных животных. Принудительное самоопыление у перекрестноопыляемых растений.

Индукция - инициация структуры органа или процесса *in vitro*.

Инженерия генная (генетическая) - практика целенаправленного изменения генетических программ половых клеток с целью придания исходным формам организмов новых свойств, или создания принципиально новых форм организмов. Это достигается с помощью конструирования несуществующих в природе сочетаний генов биохимическими и специфически - генетическими методами. Основной метод *инженерии генной* - извлечение из клеток организма гена или группы генов, соединение их с определенными молекулами нуклеиновых кислот, и внедрение полученных гибридных молекул в клетки другого организма. С помощью методов *инженерии генной* получают новые формы, в основном микроорганизмов, используемых в микробиологической промышленности, биотехнологии как сырье для лекарственных средств и т. п.

Инженерия клеточная - область биологии и биотехнологии, основанная на культивировании растительных клеток и тканей, способных в свободном состоянии (вне организма) производить нужные человеку вещества, которые обычно получают от специально выращиваемых растений. Клеточная инженерия тесно связана с инженерией генной. Один из приемов клеточной инженерии - выращивание клеточных и тканевых культур для

клонального (бесполого) микроразмножения ценных растений, затем размножаемых обычными методами.

Инокулюм (трансплант) – часть суспензионной или каллусной культуры, переносимой в свежую питательную среду.

Каллус – неорганизованная пролиферирующая масса дифференцированных растительных клеток.

Кариопласт - клеточное ядро, полученное из клетки посредством энуклеации, окруженное узким ободком цитоплазмы и клеточной мембраны.

Кариотип - набор хромосом, характерный для данного вида.

Клеточная линия – возникает из первичной культуры при первом удачном субкультивировании, название «клеточная линия» относится к таким культурам, которые включают линии клеток изначально присутствующих в первичной культуре. Если известен статус культуры, то используют термины «прерывная» или «непрерывная» культура. Если же статус неизвестен, то достаточен термин «линия».

Клон - генетически однородное потомство растения или животного, образовавшегося путем бесполого, преимущественно вегетативного размножения или из одной клетки, с использованием методов генной инженерии (клонирования). В микробиологии - потомство одной клетки.

Клональное размножение - получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному.

Кодон (триплет) - дискретная единица генетического кода, состоящая из трех последовательных нуклеотидов, в молекуле ДНК или РНК. Последовательность кодонов в гене определяется последовательностью аминокислот в полипептидной цепи белка, кодируемого этим геном.

Конъюгация - конъюгация хромосом - сближение гомологичных хромосом при мейозе, вследствие чего между ними возможен обмен отдельными участками, т. е. кроссинговер.

Криоконсервация - сохранение клеток тканей зародышей или семян при ультранизкой температуре (ниже -100°C).

Кроссинговер - обмен равными участками гомологичных (парных) конъюгирующих хромосом в результате разрыва и соединения в новом порядке хроматид, и приводящий к перерас-

пределению в них генов. Является одним из механизмов наследственной изменчивости, т. к. в результате кроссинговера увеличивается генетическое разнообразие в потомстве.

Кроссинговер (перекрест) - обмен гомологичными участками гомологичных хромосом при конъюгации (в профазе |мейоза|), приводящий к перегруппировке исходных комбинаций генов. Процент рекомбинации ниже у близко локализованных генов.

Культура зародышей - стерильное выращивание *in vitro* на/в питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура изолированных протопластов - выращивание протопластов на / в среде *in vitro* в присутствии стабилизатора. При регенерации клеточных стенок культура протопластов трансформируется в клеточную культуру.

Культура каллусных тканей - длительно выращиваемая пересадочная культура тканей, возникших вследствие пролиферации клеток изолированных фрагментов органов или самих органов растений (пыльняки, семяпочки и т.д.).

Культура корней - выращивание *in vitro* на питательной среде изолированного из верхушки или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями, с первоначальным размером 0,1 мм в длину.

Культура меристем побега - выращивание *in vitro* на питательной среде изолированного из верхушки или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями, с первоначальным размером менее 0,1 мм в длину.

Культура опухолевых тканей - длительная культура фрагментов изолированных из опухолей растений разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура-нянька – рост клеток или клетки на подлежащей культуре различного происхождения, которая в свою очередь находится в контакте с культурной средой. Культивируемая клетка или ткань может быть отделена от питательного слоя пористым материалом – фильтровальной бумагой или мембранными фильтрами.

Культуры тканевые - общий термин, который относится к изучению клеток, тканей и органов, поддерживаемых *in vitro* в течение свыше 24 часов. Обычно используются следующие варианты термина – клеточная культура - растущие *in vitro* клетки, включая культуру из одиночных клеток, в клеточных культурах клетки не организуются в ткани; тканевая культура-поддержание роста тканей *in vitro* в состоянии, при котором может происходить дифференциация и сохранение их строения и / или функции; органная культура - поддержание или рост органного примордия или целого (или части) органа *in vitro* в состоянии, при котором может происходить дифференциация и сохранение строения и / или функции; культура растительной ткани – рост или поддержание растительных клеток, тканей, органов или целых растений *in vitro*.

Лигазы - класс ферментов, катализирующих в клетках присоединение друг к другу различных молекул с использованием энергии АТФ или другого трифосфата.

Линия – культура, возникшая из штамма микроорганизма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки (см. также «клеточная линия»).

Линия - потомство одной самоопыляющейся особи у растений, потомство от близкородственного скрещивания у животных, имеющих большинство генов в гомозиготном состоянии.

Липосома - закрытый липидный пузырек, содержащий водную фазу, используют для включения экзогенных веществ, доставляемых в клетки посредством слияния липосом с клетками.

Меристема - образовательная ткань растений, долго сохраняющая способность к делению клеток, а также неспецифические клетки животных, способные к дифференцировке.

Микрокультивирование - *in vitro* клональное культивирование растений из почечных верхушек или узловатых эксплантов, обычно с ускоренной пролиферацией почек в течение субкультивирования.

Микроядерная клетка - клетка с заблокированным митозом, в которой малые группы хромосом функционируют как фокусы для переустройства ядерной мембраны, формируя таким образом микроядра, максимум которых должен быть равен общему числу хромосом.

Модификационная изменчивость - изменчивость фенотипа. Реакция конкретного генотипа на разные условия среды.

Модификация - ненаследственное изменение фенотипа, возникающее под влиянием факторов внешней среды в пределах нормы реакции генотипа.

Моногибридное скрещивание - скрещивание форм, отличающихся друг от друга одной парой альтернативных признаков.

Моноклональные антитела - сверхчистые антитела, продуцируемые клетками гибридов, образующихся при слиянии лимфоцитов (белых кровяных клеток) и злокачественных миеломных клеток.

Морфогенез - а) развитие структуры от недифференцированного состояния к дифференцированному; б) процесс роста и развития дифференцированных структур.

Мутаген - фактор, обуславливающий мутацию.

Мутагенез - метод в селекции высших растений и микроорганизмов, который позволяет искусственно получать мутации с целью увеличения продуктивности.

Мутагенный фактор - фактор вызывающий мутацию. Существуют естественные (природные), искусственные (вызванные человеком) мутагенные факторы.

Мутант - фенотипический вариант, возникший в результате действия измененного или нового гена.

Мутации – наследственное изменение генотипа. Мутации бывают: генные, хромосомные, генеративные (у гамет), внеядерные (цитотлазматические) и т.п.

Мутация - генотипическое или необратимое (наследуемое) изменение нормы реакции клетки (организма).

Наследственность - способность организмов передавать следующему поколению свои признаки и свойства, т.е. воспроизводить себе подобных.

Непрерывная клеточная культура – культура, способная к неограниченному числу удвоения популяции, часто её называют «бессмертной культурой» клеток. Такие клетки могут или не могут проявлять *in vitro* свойства неопластической или злокачественной трансформации.

Норма реакции - предел модификационной изменчивости признака, обусловленный генотипом. Пластичные признаки обладают широкой нормой реакции.

Норма реакции организма - проявление фенотипа в разных условиях существования вида.

Омнипотентность – всесильность.

Оперон - участок генетического материала, транскрипция которого осуществляется на одну молекулу информационной РНК (иРНК).

Органогенез - процесс дифференциации в каллусных клетках, сопровождающийся образованием органов (корней, побегов) *de novo* или из предсуществующих структур.

Пассаж - перенос или пересадка клеток (с разведением или без разведения) из одной культуральной емкости в другую. Этот термин является синонимом термина «субкультура», а число переноса клеток или субкультур равнозначно числу пассажей.

Первичная культура – культура, берущая начало от клеток тканей или органов, взятых непосредственно от организмов. Первичная культура может расцениваться таковой до тех пор, пока не удаются субкультуры в первое время. Затем она становится «клеточной линией».

Плазмотип (Плазмон) - совокупность всех внехромосомных наследственных элементов клетки. Или совокупность всех цитоплазматических (внеядерных) носителей наследственности – плазмид, называемый по аналогии с генотипом – плазмотипом, без включения наследственных задатков пластид. Гипотетически предполагается, что плазмотип состоит из особых материальных наследственных факторов, аналогичных генам и способных к авторедукции и передаче наследственной информации - плазмогенов.

Плотность насыщения - максимальное число клеток в культуральном сосуде при специальных условиях выращивания. Плотность насыщения выражается числом клеток на 1 см^2 в монослойной культуре или числом клеток на 1 см^3 в суспензионной культуре.

Плотность популяции – число клеток на единицу поверхности или объема среды. Общее число удвоения популяции (уровень удвоения популяции) клеточной линии или штамма за один

пассаж *in vitro* определяют со времени посева в расчете на одно удвоение: $N_d = I_n (N/N_0 \times 3.33)$, где N - число клеток в культуральном сосуде на конечный период роста; N_0 – число клеток, засеянных в культуральный сосуд; N_d – число популяционных удвоений. Лучше всего использовать число прикрепившихся клеток.

Полиплоид – ядро клетки, организм с умноженным основным числом хромосом ($3x$, $4x$ и т.д.).

Полиплоидия – краткое увеличение диплоидного набора хромосом, вызванное мутацией.

Популяция – совокупность особей одного вида, занимающих определенный ареал свободно скрещивающихся друг с другом, имеющих общее происхождение, генетическую основу и в той или иной степени изолированных от других популяций данного вида. Популяция - элементарная эволюционная структура.

Популяция клеток – совокупность клеток в культуре.

Порода – совокупность домашних животных одного вида, искусственно созданная человеком и характеризующаяся: а) определенными наследственными особенностями, б) наследственно закрепленной продуктивностью; в) экстерьером.

Примордий - первый, первичный.

Пролиферация - разрастание клеток и тканей путем размножения.

Пропагула – общий термин для обозначения органов и тканей, служащих для вегетативного размножения (синоним термина «диаспора»).

Протопласт – клетка с удаленной клеточной стенкой.

Псевдодиплоид – клетка, в которой число хромосом является диплоидным, но в результате хромосомных перестроек нарушаются нормальный кариотип и родственные связи.

Регенерация - морфогенетический ответ на стимул, который приводит к образованию органов зародышей или целых растений.

Редифференциация - переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Рекомбинация - появление новых сочетаний генов, ведущее к новым комбинациям признаков у потомства. Рекомбинация

генов - универсальный механизм, свойственный всему живому. Осуществляется в процессе кроссинговера. У многих микроорганизмов рекомбинация состоит в обмене участками молекул нуклеиновых кислот. Единицей рекомбинации служит рекон - наименьший структурный элемент гена.

Рекон - жизнеспособная клетка, реконструированная слиянием кариопласта с цитопластом.

Реконструированная клетка - синоним термина «рекон».

Репликация - ДНК-редупликация, самоудвоение молекул ДНК.

Рецессивный признак – признак, который передается по наследству, но подавляется, не проявляясь, у гетерозиготных потомков, полученных при скрещивании.

Ростовой цикл - рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная; замедления роста, стационарная, деградации.

Синкарион - гибридная клетка со слившимися ядрами.

Соматональная вариация - фенотипическая (парасексуальная) гибридизация - слияние *in vitro* растительных протопластов соматических клеток, которые различаются генетически.

Соматический клон, или соматоклон – растения, возникшие из любой формы клеточной культуры растительных соматических клеток.

Соматический эмбриогенез - образование эмбрионов (зародышевых структур) в культурах клеток и тканей способом, напоминающим нормальный зиготический эмбриогенез. Другими словами - эмбриотический эмбриогенез - это процесс эмбрионизации и развития из вегетативных или не гаметических клеток.

Сорт - совокупность культурных растений одного вида, искусственно созданная человеком, и характеризующаяся: а) определенными наследственными особенностями; б) наследственно закрепленной продуктивностью; в) структурными (морфологическими) признаками.

Стадии по Мурасиге: I - культивирование *in vitro*, характеризующееся посадкой растительной тканевой культуры в асептических условиях; II - этап культивирования *in vitro*, характеризующаяся быстрым численным возрастанием органов или других

структур; III - степень культивирования *in vitro*, характеризующаяся приготовлением пропатулы для успешного переноса в почву. При этом происходит процесс укоренения и отвердевания растений, начинается переход от гетеротрофного к аутоотрофному состоянию. IV – степень культивирования *in vitro*, характеризующаяся посадкой в почву растительной тканевой культуры, или после претрансплантной обработки материала (пропатул) в стадии III, либо (для некоторых видов) после прямого переноса растений из стадии II в почву.

Субкультивирование – перенос транспланта (инокулюма) на свежую питательную среду.

Субкультура - от термина «пассаж».

Субпротопласт – протопласт, потерявший часть цитоплазмы.

Субштамм - происходит из штамма при изоляции одиночной клетки или группы клеток, обладающих свойствами или маркерами, которыми не обладают все клетки родительского штамма.

Суспензионная культура - тип культуры, в которой клетки или их агрегаты размножаются, будучи суспендированными в жидкой питательной среде.

Сферопяст - клетка с неполностью удаленной клеточной стенкой.

Тотипотентность - клеточная характеристика способности к формированию всех клеточных типов взрослого организма, или это свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, то есть реализовывать omnipotentность ядра с образованием целого организма.

Трансгенез - перенос любым способом чужеродных генов в клетки растений.

Трансдукция - пассивный перенос бактериальных генов из одной клетки в другую частицами бактериофага, что приводит к изменению наследственных свойств клетки. Перенесенный генетический материал (участок ДНК) может оставаться в составе ДНК фага или включаться в ДНК бактерии.

Трансформация - введение и устойчивая геномная интеграция чужеродной ДНК в растительной клетке, сопровождающаяся геномной модификацией.

Трансформация - изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения или посредством искусственного привнесения в нее чужеродного ДНК, что приводит к появлению у клетки трансформанта признаков, свойственных организму-источнику ДНК. Естественная трансформация обнаружена и изучена у бактерий, но возможна и у клеток высших организмов.

Фенотип - определенная сумма признаков организма в данных внешних условиях.

Фенотип - совокупность признаков и свойств организма, проявляющаяся при взаимодействии генотипа со средой.

Гибрид - жизнеспособная клетка, возникшая в результате слияния цитопласта с клеткой - протопластом или цитопластом. При этом образуется цитоплазматический гибрид.

Гибридизация - введение цитоплазматических (внеядерных) генов в изолированный протопласт.

Цитоплазматическая наследственность - внеядерная наследственность, которая осуществляется с помощью молекул ДНК, находящихся в пластидах и митохондриях.

Цитопласт - интактная цитоплазма, остающаяся после энуклеации (удаление) ядра клетки.

Штамм - происходит из первичной культуры или клеточной линии при селекции или клонировании клеток, имеющих специфические свойства или маркеры.

Экология - наука о закономерностях взаимоотношений организмов, видов, сообществ со средой.

Эксплант – ткань, взятая из своего оригинального места и перенесенная в искусственную среду для роста и поддержания.

Элементарные эволюционные факторы - естественный отбор, мутации, популяционные волны (волны жизни), изоляция (географическая, экологическая, генетическая).

Эмбриокультура - *in vitro* развитие и поддержание изолированных зрелых или незрелых зародышей.

In vitro – опыты, выполненные в пробирке, колбе и т.д., то есть вне живого организма.

In vivo - опыты, проведенные на живом организме.

Список рекомендуемой литературы

1. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. - СПб.: Наука, 1995. - 600 с.
2. Виестур У.Э., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология, биологические агенты, технология, аппаратура. – Рига: Зинатне, 1987. - 258 с.
3. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: иммунная биотехнология: Учебно-методическое пособие. - Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2002. - 74 с.
4. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2003. - 64с.
5. Grane M.S. Mutagenesis and cell transformation in cell culture// Methods in cell science, 1999. – 21. - P. 245-253.
6. Биотехнология: Учебное пособие для вузов. В 8 книгах / Под редакцией Н.С. Егорова, В.Д. Самуиловой. - М.: Высшая школа, 1987.
7. Пироговский Р.В. Биотехнология: Учебное пособие для фармацевтических вузов. - УФА, 1998.
8. Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. –Л.: Наука, 1988. - 200 с.
9. Седых Н.В., Кристопсонс М.Ш. Контроль качества в биотехнологии. – Рига: Зинатне, 1990. - 150 с.

Владимир Жигжитович Цыренов

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ:
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Учебно-методическое пособие
Часть 3

Редактор *Т.Ю. Артюнина*

Подписано в печать 28.10.2005 г. Формат 60x84 1/16.
Усл.п.л. 2,79, уч.-изд.л.2,4. Печать операт., бум. писч.
Тираж 100 экз. Заказ № 221.

Издательство ВСГТУ. 670013. г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40, в.



В.Ж. Цыренов

***Основы биотехнологии:
культивирование клеток
человека и животных***



Улан-Удэ 2005

