О.В. Карпов, С.В. Демидов,
С.С. Кир'яченко

КЛІТИННА ТА ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ



Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

О.В. Карпов, С.В. Демидов, С.С. Кир'ячєнко

КЛІТИННА ТА ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

Підручник

Затверджено Міністерством освіти і науки України як підручник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів

Київ
2010

УДК 575+]/62(075.8)
ББК 28.04я73+3я73
К26

Затверджено Міністерством освіти і науки України як підручник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів (Лист №1.4/18-Г-1761 від 22.10.2007 р.)

Рецензенти:
Блюм Я.Б., академік НАН України;
Риндич А.В., чл.-кор. НАН України

Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С.
К26 Клітинна та генна інженерія: Підручник - К.: Фітосоціоцентр, 2010. – 208 с.

ISBN 978-966-306-152-7

У підручнику у доступній формі викладені практично всі ключові аспекти клітинної та генної інженерії – історію розвитку цих напрямків науки та технології, основні їх прийоми і використання їх здобутків безпосередньо у біотехнологічній практиці. Детально описуються приклади практичного використання геноінженерних прийомів створення рекомбінантних мікроорганізмів з метою отримання біологічно активних сполук – поліпептидів, малих біологічних молекул та біополімерів, а також деградації ксенобіотиків генетично модифікованими мікроорганізмами. Виходячи зі спрямування підручника на використання студентами біотехнологічного напряму, велику увагу в ньому приділено біотехнологічним аспектам генетичної інженерії. Наводяться приклади генноінженерних підходів до створення інтенсивних технологій у рослинництві і тваринництві. Характеризується внесок генної інженерії в медицині – генна діагностика та терапія людини, а також створення лікарських засобів на основі олігонуклеотидів. Вперше у навчальній літературі у доступній для студентів формі розглядається такий науковий напрямок, як білкова інженерія, а також проблеми, пов'язані з потенційними загрозами від впровадження трансгенних технологій та біобезпека.

Для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів, аспірантів і науковців відповідних спеціальностей.

УДК 575+]/62(075.8)
ББК 28.04я73+3я73

ISBN 978-966-306-152-7

© Карпов О.В., Демидов С.В.,
Кир'яченко С.С., 2010

ЗМІСТ

1. Загальні положення 5

2. Клітинна інженерія 8

2.1. Культивування еукаріотичних клітин 8

2.2. Стовбурові клітини. Клітинна терапія 15

2.3. Культури рослинних тканин та клітин 25

2.4. Гібридні клітини та трансплантація ядер 41

2.5. Методи перенесення генів за допомогою метафазних хромосом 45

3. Генна інженерія 50

3.1. Ферменти, використовувані для отримання рекомбінантних молекул ДНК 50

3.2. Секвенування та синтез полінуклеотидів 60

3.3. Прийоми та методи генної інженерії 72

3.3.1. Джерела генів 74

3.3.2. Вектори 81

3.3.3. Операції на ДНК та РНК 93

3.3.4. Внесення генетичного матеріалу до клітин-реципієнтів 98

3.4. Банки генів. Пошук клонів з рекомбінантними молекулами ДНК 100

3.4.1. Банки генів 100

3.4.2. Ідентифікація клонованих ДНК 102

4. Отримання біологічно активних сполук методами генної інженерії 115

4.1. Біологічно активні поліпептиди 115

4.2. Малі біологічні молекули 123

4.3. Біополімери 128

4.4. Деградація ксенобіотиків. Супербацила 130

5. Біотехнологічні аспекти генетичної інженерії 133

5.1. Об'єкти генетичної інженерії 133

5.2. Особливості експресії еукаріотичних білків в прокаріотичних клітинах 135

5.3. Суперпродукція і проблеми стабільності штамів 136

5.4. Виділення внутрішньоклітинних чужорідних білків з культур рекомбінантних мікроорганізмів 139

6. Генно-інженерні підходи до створення інтенсивних технологій у рослинництві 143

6.1. Трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Ті-плазміда 143

6.2. Біолістика 147

6.3. Застосування репортерних генів при трансформації рослинних клітин 148

6.4. Трансгенні рослини 149

7. Генно-інженерні підходи до створення інтенсивних технологій у тваринництві 157

8. Генна інженерія в медицині 165

8.1. Генна діагностика та терапія людини 165

8.1.1. Молекулярно-генетичний метод у генній діагностиці 165

8.1.2. Техніка генної терапії 168

8.2. Генно-інженерні підходи до створення вакцин 180

8.2.1. Генно-інженерні вакцини 181

8.2.2. ДНК-вакцини 184

8.3. Лікувальні засоби на основі олігонуклеотидів 187

9. Геноміка, протеоміка, білкова інженерія 191

10. Потенційні загрози від впровадження трансгенних технологій та біобезпека 197

Література 208

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Сучасна біоінженерія відкриває радикально нові шляхи цілеспрямованої зміни генетичних властивостей організмів. Такі можливості з'явилися завдяки відкриттям молекулярної біології, визначенню структури і властивостей ДНК як матеріалу спадковості, генетичного коду, методів зчитування генетичної інформації (секвенування генів), а також широкого застосування ферментів, за допомогою яких можна розрізати і з'єднувати ділянки ДНК у визначений спосіб.

Більшість інформації, яка забезпечила розвиток технологій, заснованих на використанні рекомбінантної ДНК, і, отже, успіхи сучасної біоінженерії, було накопичено протягом останніх 40-50 років. Однак історія біоінженерії почалася понад 130 років тому, одночасно з дослідженнями Ч. Дарвіна і Г. Менделя. У своїх працях Ч. Дарвін зробив висновок про те, що види не є постійними й незмінними, а здатні еволюціонувати і згодом давати, таким чином, нові види. У процесі здійснюваної штучної селекції рослин і тварин відбувається аналогічне явище, хоча не природа, а селекціонер забезпечує селекційний вплив, підсилюючи саме ті особливості організмів, які треба зберегти.

Основи сучасної генетики заклав Г. Мендель. У процесі досліджень він відкрив основні закони, що керують спадковістю. По суті Г. Мендель став автором концепції гена, хоча цей термін до початку XX ст. не використовувався

Завдання, що їх вирішує біоінженерія, виникли з потреб класичних біотехнологій. Основа вирішення їх – наявність високопродуктивних штамів мікроорганізмів. При організації виробництва нових продуктів більшість мікроорганізмів-продуцентів виявляються малопродуктивними "дикунами". Старі бродильні мікробіологічні процеси (виробництво пива, вина, спирту) споконвіку потребували тих самих, практично однакових за своєю продуктивністю штамів, оскільки вони здійснювали той самий якісний процес – гідролітичне перетворення цукру на спирт, солодового сусла на пиво, виноградного сусла на вино тощо. При цьому завдання підвищити продуктивність у бродильному виробництві штамів не ставилося, оскільки їхня продуктивність у кінцевому підсумку визначалася кількістю розщеплених молекул, присутніх у середовищі. Це завдання постало лише після відкриття антибіотиків, коли знадобилося створити нові високоактивні штами, здатні синтезувати максимум продукту.

Протягом 70-х років XX ст. було опрацьовано методи об'єднання частин ДНК та її переміщення з одного організму в інший; загалом ці методи отримали назву технології рекомбінантних ДНК, або ж генної

інженерії. Генну інженерію, отже, можна визначити як конструювання в умовах *in vitro* функціонально активних генетичних структур (рекомбінантних ДНК) або ж інакше – як створення штучних генетичних програм.

Генна інженерія виникла на перетині багатьох біологічних наук. Її витоки, передусім, слід шукати в молекулярній генетиці. Проте становлення генної інженерії великою мірою залежало також від розвитку генетичної ензимології та хімії нуклеїнових кислот. Слід підкреслити, що ферменти, які застосовуються у генній інженерії, позбавлені видової специфічності, і тому експериментатор може поєднувати в єдине ціле фрагменти ДНК будь-якого походження у тій послідовності, яку він вибере. Отже, генна інженерія виявилася здатною долати встановлені природою видові бар'єри і здійснювати необмежене міжвидове схрещування.

Основи використання клітин людини й тварин у біоінженерії було закладено в 1949 р., коли вдалося виростити вірус поліомієліту в культивованих клітинах шкіри та м'язів зародка людини. Методи *клітинної інженерії* найбільше поширилися у рослинництві. До них належать мікроклональне розмноження, оздоровлення рослин від вірусів, культивування незрілих зародків та сомаклональна мінливість.

Технологія рекомбінантної ДНК, на противагу напівемпіричним підходам клітинної інженерії, спроможна реалізувати свій вагомий науковий потенціал тільки в результаті детального молекулярно-біологічного та генетичного дослідження об'єктів та їхніх господарсько-вагомих ознак.

Важливі кроки в розвитку знань, необхідних для становлення генної інженерії, зроблено в 1953 р., коли Дж. Уотсон і Ф. Крик довели, що ДНК складається з двох ланцюгів, та у 1963 р., коли М. Ніренберг розшифрував генетичний код, що виявився квазі-універсальним як для вірусів та бактерій, так і для вищих організмів, включаючи людину. Тим самим доступними для вивчення стали генетична інформація та її суть, тобто взаємозв'язок між генетичним кодом та структурою білків.

У 60-і роки XX ст. у результаті вдосконалення аналітичних методів, запропонованих Ф. Сенджером, і розвитку прийомів розщеплення білків виникла можливість автоматично визначати структуру білків. Було створено прилади, що дають змогу визначати амінокислотні послідовності білків. Саме тоді й було розпочато укладання атласу білків, що зберігається у комп'ютерних системах.

Велике значення мають успіхи хімії нуклеїнових кислот і, передусім, опрацювання методів *секвенування* ДНК, тобто визначення послідовності нуклеотидів у молекулах ДНК, здійснене А. Максамом і У. Гілбертом, а також Ф. Сенджером у 1977 р. Інший здобуток хімії, на якому базується

сучасна генна інженерія – це способи *хімічного* та *хіміко-ензиматичного синтезу полінуклеотидів*. Основи цього синтезу було заклав у 1979 р. Г. Корана.

Стрімкий прогрес у генній інженерії тісно пов'язаний також із суттєвими вдосконаленнями таких аналітичних методів, як ультрацентрифугування, введення в молекули радіоактивних ізотопів, електрофорез у всіх його різновидах, афінна хроматографія, а також методів мікроаналізу та визначення первинної структури біологічних макромолекул.

Датою народження генної інженерії слід вважати 1972 р., коли американські вчені на чолі з П. Бергом створили першу рекомбінантну ДНК, що складалася з фрагментів ДНК мавпячого вірусу SV40 і бактеріофага λ, поєднаних з галактозним опероном *E. coli*.

Подальшу історію розвитку генної інженерії умовно поділяють на три етапи. *Перший* пов'язаний з доказом принципової можливості отримати рекомбінантні молекули *in vitro*. На цьому етапі було доведено потенційну можливість створення рекомбінантних молекул із використанням вихідних молекул ДНК з різноманітних видів і штамів бактерій, а також їхня життєздатність, стабільність та дієздатність. *Другий етап* був розпочатий роботами з отримання рекомбінантних молекул ДНК між хромосомними генами прокаріотів та різними плазмідами, а також доведенням їхньої стабільності та життєздатності. І, нарешті, початок *третього етапу* асоціюється з роботами, у яких у векторні молекули включали ДНК еукаріотичних генів, головним чином, тваринних.

Основні *прийоми*, які використовуються в різних напрямах біоінженерії, подібні і можуть бути об'єднані в дві групи: *методи культури клітин і тканин* та *маніпуляції з ДНК*.

Протягом останніх років генна інженерія досягла приголомшливих результатів. Складено карти цілих геномів, у тому числі повністю визначено послідовність геному людини. Завдяки генній інженерії розроблено й впроваджено нові препарати, що використовуються у багатьох галузях. Видозміна вихідних організмів дає можливість одержувати молочні й м'ясні продукти з поліпшеними органолептичними якостями і збільшеним терміном зберігання, а також із характеристиками, що полегшують механізацію виробничих процесів. Створено рослини з новими типами стійкості проти хвороб.

Отже, генну інженерію можна вважати дітищем сучасного науково-технічного прогресу. У такий спосіб біологічна наука, збагачена досягненнями ензимології й генетики, створює систему взаємопов'язаних галузей біоінженерії.

2. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

Важливий розділ біоінженерії становить клітинна інженерія. Культури клітин вищих організмів використовуються для виробництва біологічно активних речовин, вакцин, моноклональних антитіл, застосовуються при виведенні нових сортів рослин тощо. Культури рослинних клітин – це зручна модель для вивчення системи хазяїн-паразит (вірус, бактерія, гриб, нематода, комаха), а також для пошуку важливих для господарства речовин (токсинів, гербіцидів, регуляторів росту тощо). Чисті культури рослинних клітин застосовуються також у біосинтетичних та біотрансформуючих реакціях.

Завдання, що стоїть перед клітинною інженерією на перспективу, можна сформулювати як створення в умовах *in vitro* тривимірної системи клітинних структур та їхніх похідних, здатних анатомічно та функціонально заміщувати *in vivo* пошкоджені та втрачені тканини й органи живих організмів. З цього визначення зрозуміло, що область застосування здобутків цього напряму – насамперед медицина, зокрема реконструктивна та відновлювальна хірургія.

2.1. Культивування еукаріотичних клітин

Організм тварин складається з різноманітних типів спеціалізованих диференційованих клітин. Так, наприклад, у людини (як і в більшості ссавців) ідентифіковано понад 200 типів клітин, які, в свою чергу, можуть бути розподілені на ще більшу кількість функціонально й морфологічно спеціалізованих типів клітин. За сучасними уявленнями вся різноманітність фенотипів соматичних спеціалізованих клітин базується на тому, що в кожному конкретному клітинному типі функціонує властивий лише цьому типу набір експресованих генів.

Одним з головних завдань, що вирішується з використанням культур еукаріотичних клітин є напрацювання великих кількостей різноманітних вірусів для подальшого використання їх з метою діагностики вірусних захворювань та створення відповідних вакцин. Виявилося можливим вирощувати віруси у трансформованих клітинах, що підтримуються у культурі протягом невизначено довгого часу. Створено лінії клітин, що використовуються з цією метою в усьому світі. Приклади таких ліній – це клітини *HeLa* (карцинома шийки матки людини) (Рис. 1), *ВНК-21* (нирка ембріонів хом'яка) та *Vero* (нирка зеленої мавпи). Завдяки застосуванню методу клітинних культур віруси почали виділяти в досить чистому вигляді. Не становить великих труднощів виробництво (у спеціальних ферментерах) сотень і навіть тисяч літрів культуральної рідини, що містить вірус.

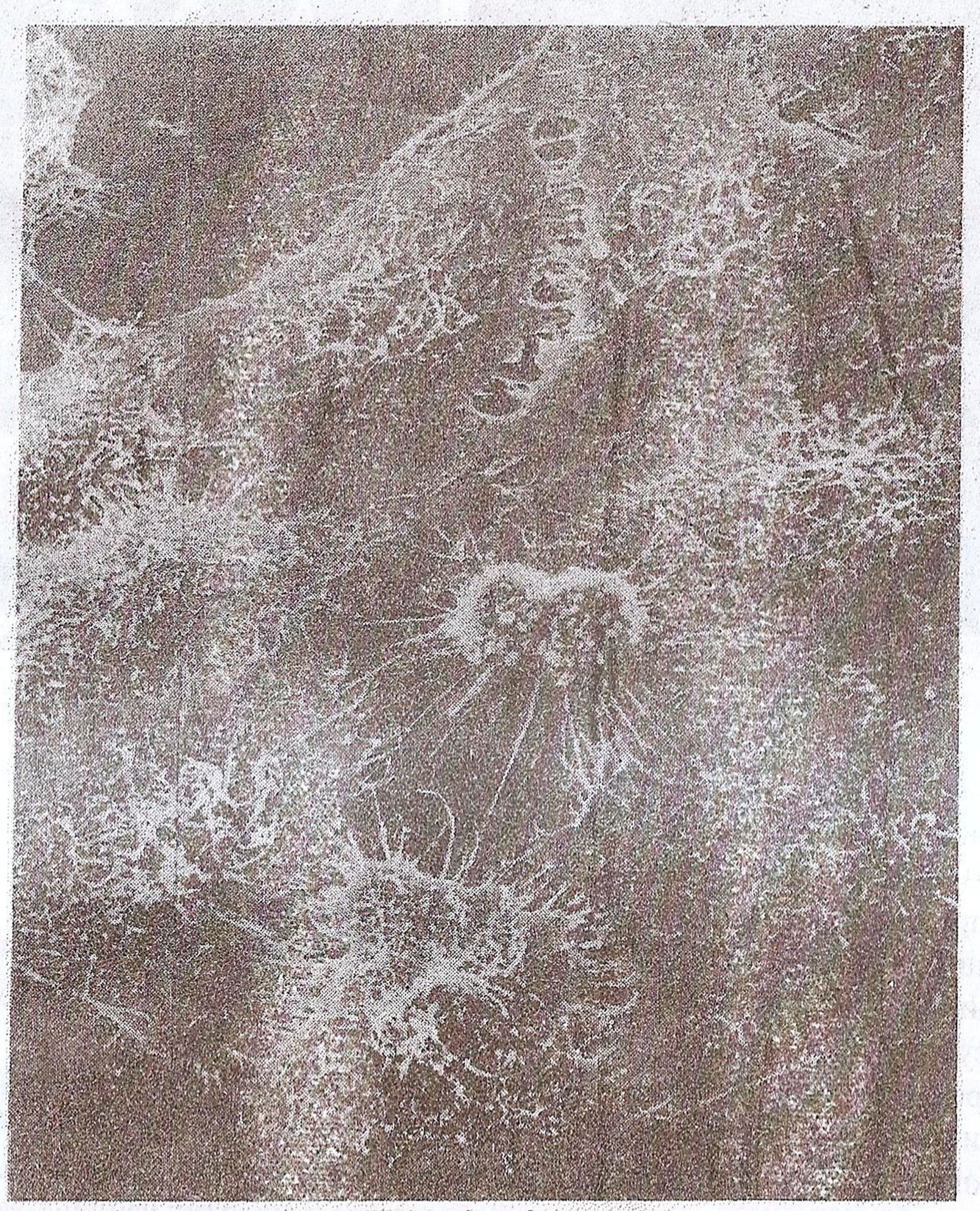


Рис. 1. Клітини культури *HeLa* під мікроскопом

Для промислового виробництва біологічно активних речовин вважається перспективним використання культури клітин відповідних органів людини та тварин (Рис.2). На перший погляд, вирішити цю проблему досить не складно. Клітини тварин і людини вирощують на спеціальних середовищах у вигляді моношару на склі. Для вирощування суспензійних культур використовують найрізноманітніші посудини – хемостати, ферментери, флакони. Нині існують добре відпрацьовані методи переведення клітин у культуру. Залишається лише виділити з тканин організму клітини, що синтезують ту чи іншу цінну речовину, перенести їх на відповідне живильне середовище, наростити потрібну біомасу та отримати бажаний продукт.

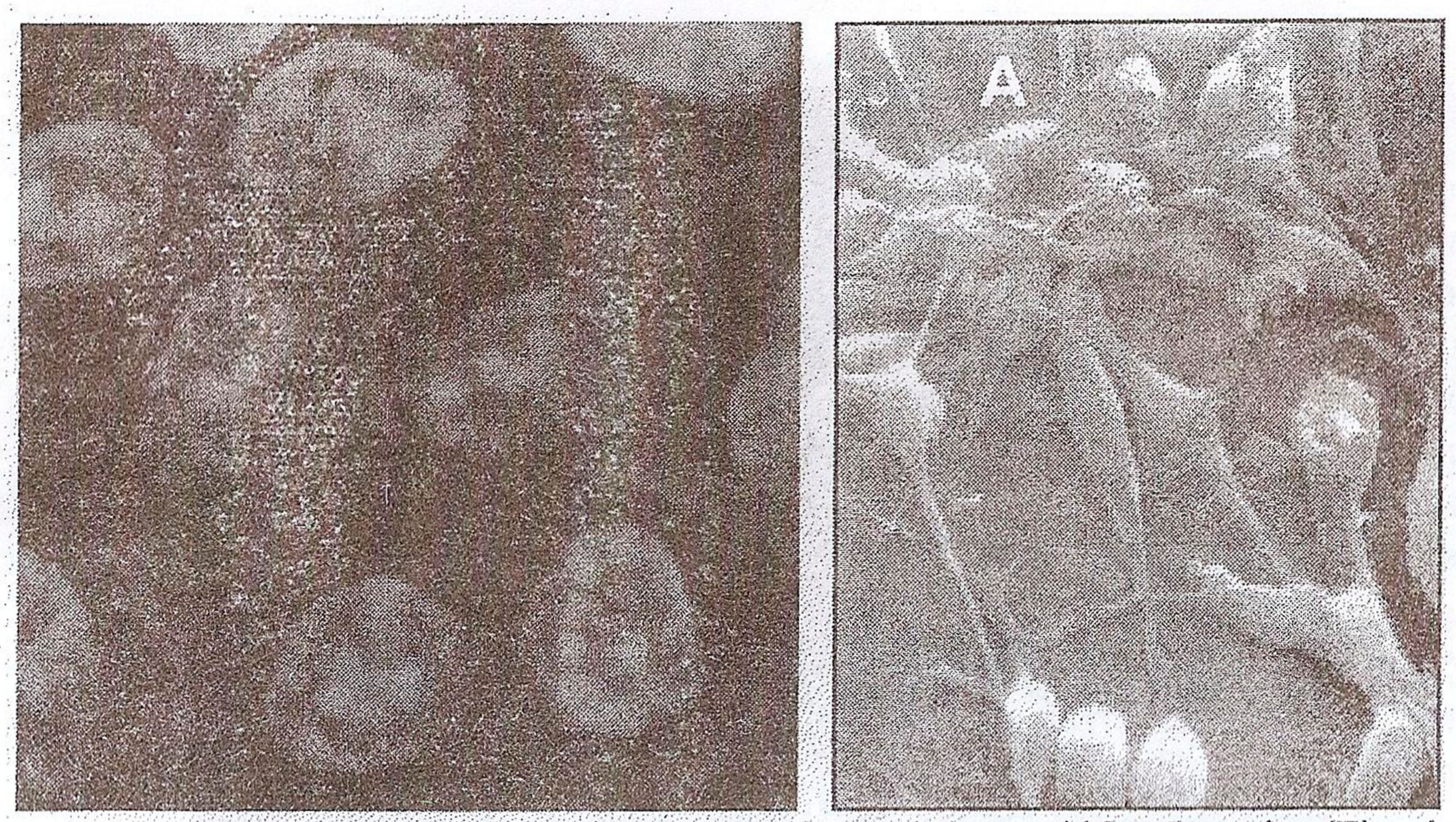


Рис. 2. Культури епітеліальних клітин (А) та фібробластів (Б) під мікроскопом.

Як правило, здатність синтезувати продукт, специфічний для даного органу або тканини, мають диференційовані клітини, тобто клітини, що спеціалізувалися у ході розвитку організму для виконання певних функцій, як, наприклад, клітини ендокринних залоз. Спроби введення таких диференційованих клітин у культуру й отримання з них постійних клітинних ліній-продуцентів фізіологічно активних речовин, наштовхується на ряд суттєвих труднощів.

Передусім, диференційовані клітини у разі занурення їх у культуральне середовище розмножуються дуже погано або зовсім втрачають здатність ділитися. Якщо ж адаптація нормальних клітин до культивування все-таки відбувається, то вони, як правило, втрачають свої тканиноспецифічні функції, включаючи й здатність до синтезу специфічного продукту. Ті ж клітини, які зберегли свої функціональні особливості, часто проявляють ознаки злоякісної трансформації, що теж накладає суворі обмеження на практичне їх застосування.

Одна з головних властивостей клітинних культур тварин – обмежена тривалість їхнього існування. Це обмеження, на відміну від бактерій, зберігається навіть за умови постійного перенесення їх на свіже живильне середовище. Як правило, клітини тваринних ліній гинуть після 50-100 поділів. Зрозуміло, що чим молодший вік тканини, з якої отримано клітини для культивування в культурі, тим більшу кількість разів вони здатні ділитися до моменту загибелі. Що ж стосується рослинних клітин, то дані, отримані з розмноження саджанцями, свідчить про необмежену здатність рослинних клітин до поділу.

Тваринні клітини вирощують декількома способами. Ріст клітин у вигляді моношару залежить від білків, які забезпечують прикріплення клітин до підложки та вказують напрямок їхнього переміщення (Рис. 3).

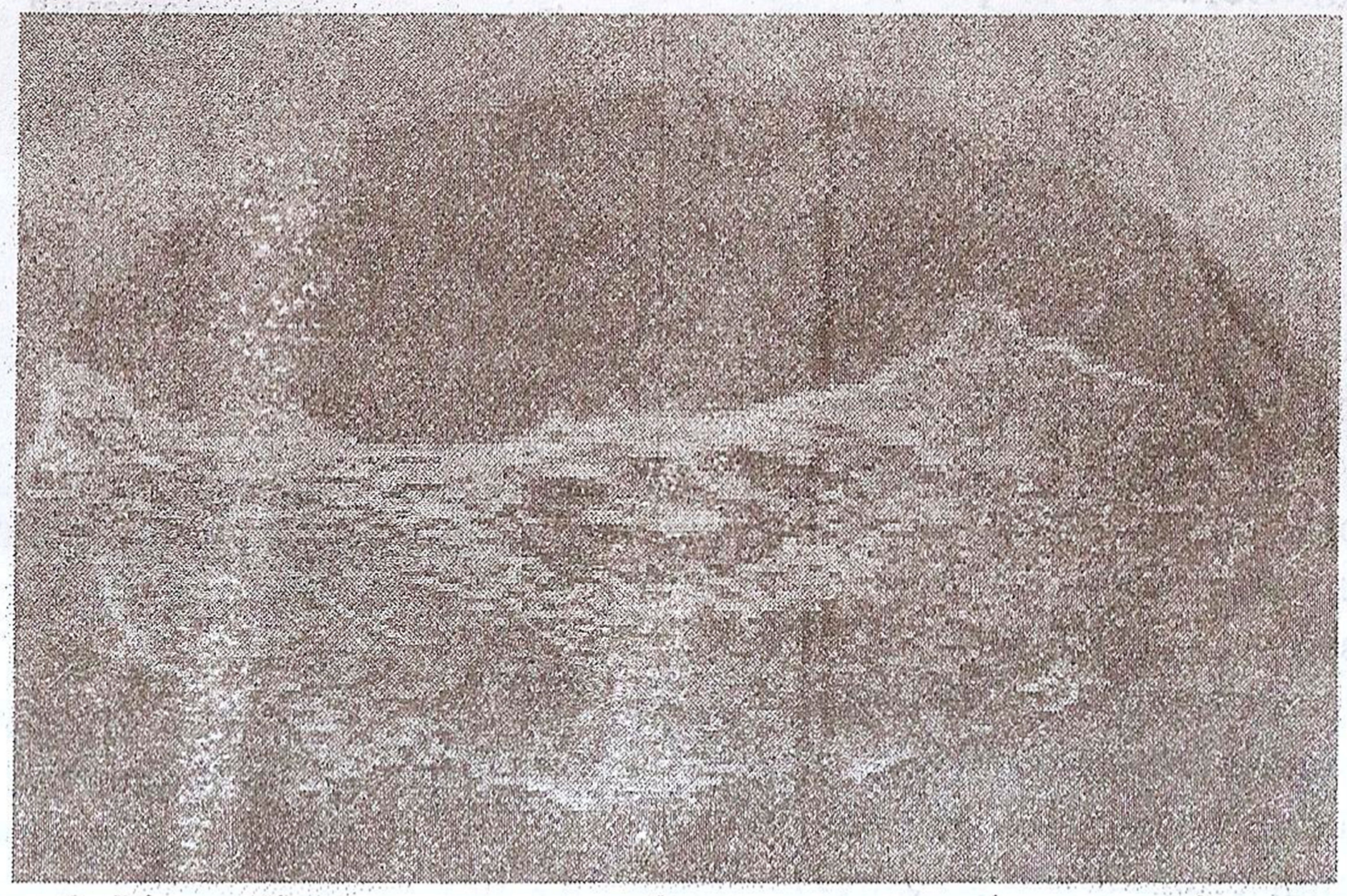


Рис. 3. Ріст субстратзалежних клітин на поверхні у вигляді моношару.

Обрані клітини вирощують в асептичних умовах на спеціальному обладнанні при повільному струшуванні з метою омивання більшої площини культуральним середовищем. При цьому клітини почергово занурюються то в рідку фазу, то в газову, що з надлишком забезпечує їх потребу у кисні.

Під час культивування клітин повинні враховуватися різні фактори – якість посівного матеріалу та середовища, pH та температура, наявність кисню і диоксиду вуглецю, окисно-відновний потенціал, концентрації основних джерел живлення. Оптимальні показники вирощування клітин: pH від 7,2 до 7,4; температура – у межах 36-37,5^{0}C. Контроль за розвитком клітин проводять за допомогою прямих методів, тобто шляхом підрахунку клітин.

Тваринні клітини при культивуванні *in vitro* потребують багатьох поживних речовин. До складу таких речовин повинні входити органогенні елементи (вуглець, водень, кисень, азот), зольні мікроелементи (фосфор, сірка, калій, кальцій, залізо), деякі інші мікроелементи (мідь, натрій, хлор, тощо). Вказані елементи повинні знаходитися у формі легкозасвоюваних сполук. У поживні середовища для культивування тваринних клітин необхідно додавати суміш амінокислот у якості джерела азоту, пурини та піримідини для синтезу білків і нуклеїнових кислот, глюкозу у якості

джерела вуглецю та енергії, вітаміни і мінеральні солі для підтримки необхідного осмотичного тиску та pH. Середовище також повинне містити невеликі концентрації антибіотиків для пригнічення росту бактерій та 5-10% сироватки. Остання відіграє роль фізіологічного буферу, є джерелом поживних речовин, бере участь у процесах адгезії, росту та розмноження клітин, сприяє зв'язуванню та детоксикації пірогенів, токсинів, а також продуктів метаболізму клітин. Найбільш універсальною для культивування багатьох клітин є сироватка крові корови.

Суттєвим для підтримання функціонально активного стану клітин у культурі було розроблення відтворюваних умов культивування. Створено стандартні прописи ефективних живильних середовищ, найвідоміше з яких – середовище Ігла. При цьому, якщо до складу живильного середовища вимоги з боку клітин не дуже суворі, то можливі коливання реакції середовища досить обмежені. Так, зменшення або збільшення pH на 0,2–0,4 од. призводить до загибелі клітин у культурі. У разі тривалішого культивування підвищується потреба у буферному розчині. Як правило, перевагу віддають гліцил-гліциновому, трис- та ХЕПЕС-буферам. Щодо сироватки як необхідного компоненту середовища, то її вплив на функціональний стан клітин у культурі тим вищий, що молодша тварина, від якої отримано цю сироватку.

Для забезпечення стерильності як однієї з найсуворіше контрольованих умов останнім часом практикується використання одноразового стерильного пластикового посуду (флаконів, чашок, піпеток). Так, поділ деяких типів клітин у культурі відбувається лише тоді, коли вони прикріплені до субстрату. У цьому разі матеріал і посуд піддають спеціальній обробці при підготовці до культивування.

Клітинну масу для культивування отримують, обробляючи подрібнені шматочки відповідного органу трипсином. Отримують окремі клітини, які з урахуванням усіх обмежень, викликаних необхідністю додержання стерильності, переносять на живильне середовище для культивування. Поодинокі еукаріотичні клітини не здатні ділитися – вони швидко гинуть. З урахуванням цієї властивості у ході культивування створюють так званий шар «клітин-годувальниць» (фідерних клітин). З цією метою призначені для клонування клітини наносять на клітини-годувальниці, які після опромінення втратили здатність до поділу, але ще на якийсь час зберегли метаболізм. Цього виявляється досить, щоб нанесені клітини, призначені для клонування, почали ділитися (Рис. 4). Однак кількість клітин, що вступили у фазу поділу, завжди менша за 100 % порівняно з кількістю клітин, внесених у живильне середовище. При додаванні у живильне середовище деяких речовин – так званих *мітогенів* – здатність клітин до поділу підвищується.

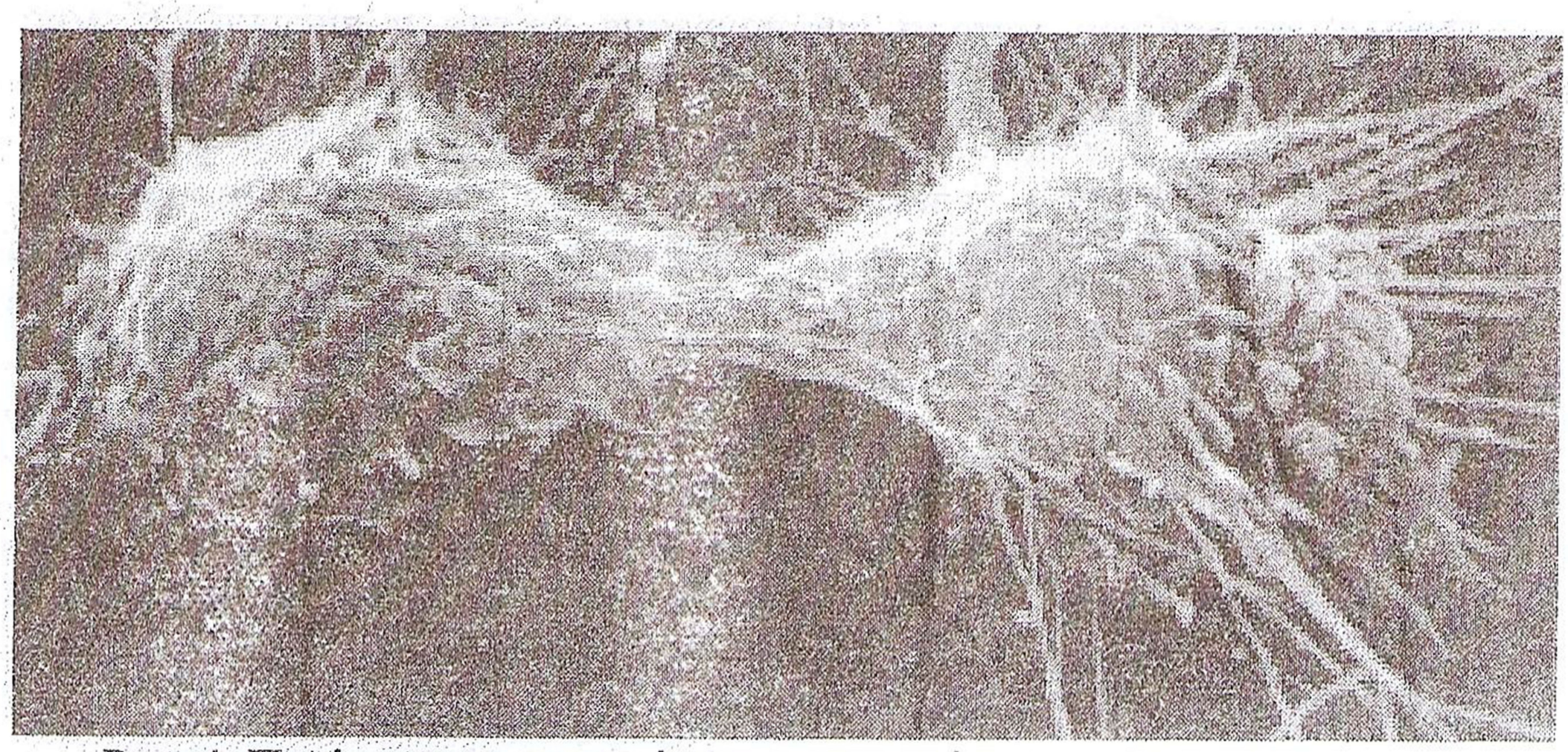


Рис. 4. Поділ пухлинних клітин у культурі.

Серед мітогенів розрізняють групу речовин (фактори росту), що містяться у сироватці крові в дуже незначних кількостях і мають властивості гормонів. Ідентифіковано такі з них, як фактор росту нервів, епідермісу, фібробластів та ін. Всі вони являють собою білки з молекулярною масою 6 –130 кДа. Спектр їхньої дії ширший, ніж просто посилення мітозу.

Крім факторів росту, мітогенна дія притаманна також речовинам, що називаються *лектинами*. Загальна їхня властивість – це здатність специфічно зв'язувати залишки цукрів. Залежно від кількості ділянок, з якими вступають у взаємодію цукри, розрізняють дво- та полівалентні лектини. Головне джерело лектинів – рослини родини бобових (там лектини складають 1,5-3 % від загальної кількості білку), хоча з бактерій, безхребетних та хребетних тварин теж виділено лектини. Із насіння рицини отримано рицин, з конвалії мечоподібної – конканавалін А (КонА), із насіння квасолі – фітогемаглютинін (ФГА). При насиченні середовища, що містить лектини, моносахаридами, лектини втрачають здатність взаємодіяти з рецепторами клітинної поверхні, які містять вуглеводи. Це відбувається тому, що специфічні ділянки лектинів, з якими могли б вступати у реакцію вуглеводні рецептори клітинної стінки, вже «захоплені» раніше доданими моносахаридами.

Окрім моношарового можливе також глибинне вирощування клітин у суспензійних культурах. Поверхню вирощуваних клітин можна суттєво збільшити при використанні мікроносіїв, на поверхні яких клітини закріплюються, а потім розростаються у вигляді моношару. У якості мікроносіїв використовують сефадекси, полістирол, скляні кульки тощо.

Наразі розроблені методи вирощування клітин у вигляді об'ємно-доливних культур, коли певна частина клітинної суспензії замінюється свіжим живильним середовищем, а інша частина виконує роль інокуляту. Невизначено довгий час клітини можна вирощувати у безперервних хемостатних культурах, коли вдається досягти постійності концентрації лімітуючого субстрату та щільності клітин. У хемостатах швидкість подачі свіжого середовища та відбору культури однакова. При цьому швидкість росту, розвитку та розмноження клітин контролюється швидкістю підводу лімітуючого компоненту а кількість клітин – концентрацією останнього. У якості лімітуючого ріст агента частіше за все використовують глюкозу. При вірному підборі умов вирощування у хемостатах, на відміну від періодичного культивування, вдається на порядок збільшити вихід клітин.

Щодо типу культивованих клітин, то диплоїдні клітини мають беззаперечну перевагу перед всіма іншими клітинними культурами, насамперед завдяки стабільності їх біологічних і генетичних характеристик, збереження властивостей при пасуванні, а також завдяки можливості створення банку клітин та попередньої атестації безпеки клітин, що робить їх перспективним субстратом для діагностики вірусних інфекцій і створення імунобіологічних препаратів.

Характеристичний параметр поведінки клітин у культурі становить так зване *контактне гальмування*, тобто регуляція клітинного росту, що залежить від кількості клітин на одиницю площі. Максимальна щільність клітин, доступна для нормальних клітин у культурі, сягає $10^4/см^2$; щільність злоякісних клітин на два порядки вища ($10^6/см^2$). Крім того, нормальні клітини, що ростуть на субстраті, являють собою моношарове утворення; водночас ріст пухлинних клітин характеризується «безладдям», у результаті чого виникають багатошарові утворення.

Пухлинні клітини, переведені в культуру, або ж нормальні клітини, трансформовані *in vitro*, у ряді випадків зберігають здатність синтезувати специфічні продукти. Скажімо, пухлинні клітини гіпофізу в культурі синтезують адренокортикотропний гормон та гормон росту, клітини нейробластоми – фактор росту нервової тканини й ацетилхолінестеразу тощо. А втім, і для цих клітинних ліній не сходить з порядку денного проблема злоякісності й нестабільності прояву фенотипових ознак.

Структурною одиницею нервової системи є нейрон – нервова клітина з відростками. Біотехнологічні методи дають можливість вирощувати нейрони *in vitro* та постачати їх у потрібній кількостях для потреб медицини, адже регенерація нервової тканини не відбувається (регенерувати можуть лише відростки нервових клітин, які не втратили зв'язку з перикаріоном після пошкодження).

2.2. Стовбурові клітини. Клітинна терапія

Один з розділів регенеративної клітинної медицини, що обіцяє величезний прогрес у лікування багатьох важких захворювань, – це вивчення так званих *стовбурових клітин*. Стовбурова клітина – це «недозріла» клітина, здатна до самооновлення та розвитку, що призводить до виникнення спеціалізованих клітин організму.

Як відомо, мільярди клітин організму (людини або тварини), який росте, походять лише з однієї клітини (зиготи), утвореної в результаті злиття чоловічої та жіночої гамет. Ця єдина клітина містить не тільки інформацію про організм, але й схему свого послідовного розвитку. У ході ембріогенезу запліднена яйцеклітина ділиться й дає початок клітинам, що не мають інших функцій, крім передачі генетичного матеріалу наступним клітинним поколінням. Це *ембріональні стовбурові клітини*, геном яких знаходиться в «нульовій точці»; механізми, що визначають спеціалізацію, ще не ввімкнені, з них потенційно можуть розвинутися будь-які клітини.

Унікальна властивість ембріональних стовбурових клітин — *тотипотентність* (від лат. *totus* – весь і *potentia* – сила), тобто здатність дати початок багатьом різним типам клітин, а також позаембріональним тканинам (як-от плацента, ембріональні оболонки) і зародкові в цілому. У культурі ембріональні стовбурові клітини мають практично необмежений потенціал проліферації. Ця властивість ембріональних стовбурових клітин дала поштовх до інтенсивного їх вивчення й відкрила широкі перспективи практичного їх використання в біології та медицині, у першу чергу в трансплантології, імунології й геронтології.

У дорослому організмі стовбурові клітини знаходяться, головним чином, у кістковому мозку та, у дуже невеликих кількостях, у всіх органах та тканинах. Вони забезпечують відновлення пошкоджених ділянок органів і тканин. Стовбурові клітини, отримавши від регуляторних систем сигнали про якесь пошкодження, по кров'яному руслу надходять до ураженого органа. Вони можуть відновити практично будь-яке пошкодження, перетворюючись на місці в необхідні організму клітини (кісткові, гладеньком'язові, печінкові, клітини серцевого м'язу або навіть нервові) і стимулюючи внутрішні резерви організму до відновлення органу або тканини.

Високодиференційовані клітини (кардіоміоцити, нейрони) практично не діляться, у той час як менш диференційовані клітини (фібробласти, гепатоцити) частково зберігають здатність до розмноження і за певних умов діляться та збільшують свою кількість. Загальна закономірність така, що коли клітина вийшла на етап диференціювання, то кількість поділів, яку вона може пройти, обмежена – явище, про яке згадувалося вище. Так, наприклад, для фібробласта кількість поділів не перевищує 50, для

стовбурової клітини крові – 100. Таке явище має велике біологічне значення: у випадку, якщо відбулося пошкодження в геномі клітини, мутацію буде розтиражовано лише в обмеженій кількості клітин-нащадків і вона не відіграє великої ролі для організму в цілому.

Ембріональні стовбурові клітини відрізняються від інших (дорослих) клітин тим, що теоретично для них кількість поділів їх невичерпна й клітини можуть ділитися безперервно, причому без переродження у злоякісні пухлини. Таким чином, друга важлива властивість ембріональних стовбурових клітин – фактичне безсмертя (*імморталь*ність). Ці клітини мають так званий мінімальний фенотип і мінімум рецепторів та програм для взаємодії з мікрооточенням, Свої унікальні генетичні властивості вони зберігають завдяки виключенню програм спеціалізації і обмеженням у рамках певних клітинних ліній.

Усі спеціалізовані клітини дорослого організму походять з ембріональних стовбурових клітин. Стовбурові клітини – це «недоторкненний запас» інформації ембріогенезу, яку неможливо звести тільки до генів, оскільки кожен етап розвитку не запрограмований автоматично, а залежить від сигналів мікрооточення. Вважається, що всі нормальні органи і тканини людини зберігають «релікти» зародкової тканини у вигляді мікровкраплень стовбурових клітин.

У 1999 році журнал "Science" визнав відкриття ембріональних стовбурових клітин людини третьою за важливістю подією в біології XX сторіччя (після відкриття подвійної спіралі ДНК та здійснення програми «Геном людини»). Дійсно, вчені вперше отримали прототип тієї «клітини-праматері», яку в процесі відбору еволюція обрала для відтворення виду в кожному новому поколінні. Фактично ембріональні стовбурові клітини – це сховище, яке зберігає тривимірні карти зародків і коди для створення спеціалізованих ліній клітин.

Вивчення ембріогенезу людини обмежене біоетикою, оскільки ранні зародки людини не можуть бути засобом у руках вченого. Оскільки розвиток інших ссавців має свої особливості, ембріональні стовбурові клітини дають єдину експериментальну можливість для вивчення аномалій органогенезу людини (Рис. 5).

Запас стовбурових клітин дорослого організму дуже невеликий. Тому в більшості випадків обновити втрачені клітини організм самостійно вже не в змозі: або вогнище ураження завелике, або організм ослаблений, або ж вступають в дію вікові фактори. Зараз проводяться роботи по лікуванню за допомогою екзогенно введених стовбурових клітин таких захворювань, як цироз, інсульт, параліч, діабет та ряд патологій нервової системи. Досягнення в цій галузі клітинної медицини роблять можливості терапевтичного використання стовбурових клітин практично безмежними.

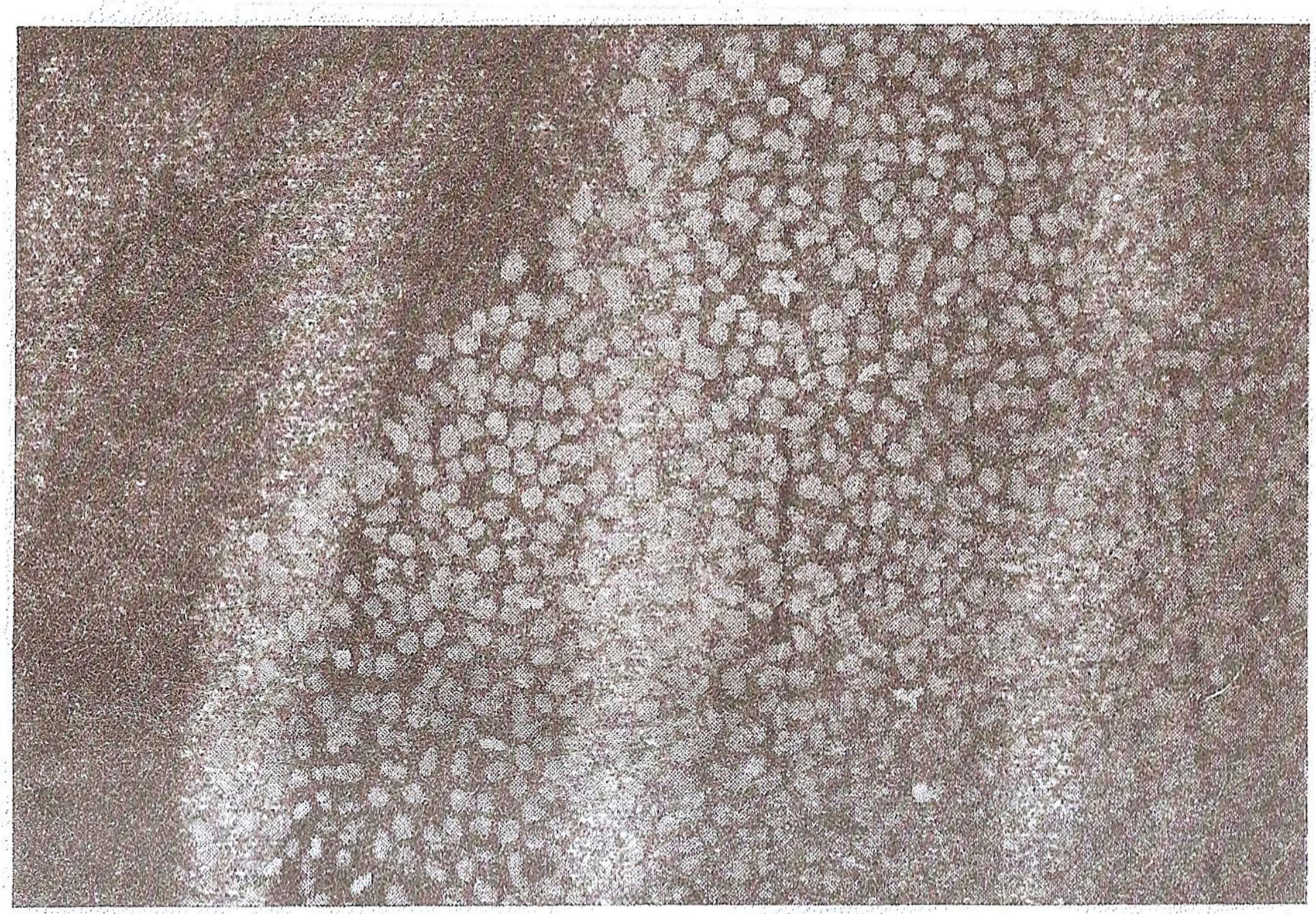


Рис. 5. Культура ембріональних стовбурових клітин людини під мікроскопом

Слід, однак, зазначити, що можливості ембріональних стовбурових клітин як нової лабораторної сировини надзвичайно обмежені. Протягом перших днів поділу ембріон росте і перетворюється на кульку з однакових неспеціалізованих клітин. Через 5-6 діб після запліднення людський ембріон складається із 100-150 клітин, які тільки починають спеціалізуватись. Він являє собою сферичну структуру, названу бластоцистом, який має зовнішній шар клітин та порожнину, де утворюється внутрішня клітинна маса (Рис. 6).

Із зовнішнього шару розвивається плацента та інші підтримувальні структури, а з внутрішньої клітинної маси – органи та тканини плоду. Саме з внутрішньої клітинної маси відбирають клітини та переносять у чашки Петрі з клітинами-годувальницями. Через декілька днів у чашці утворюється колонія клітин, які відносять до ембріональних стовбурових, якщо вони відповідають двом умовам: дають позитивний результат на стандартні тести і мають здатність до самопідтримання.

У лабораторних умовах можна спонукати отримані стовбурові клітини до розмноження та утворювати цілий ряд спеціалізованих клітин. Таке розмноження стало можливим завдяки двом технологічним новинкам: використанню так званого лейкемічного інгібіторного фактору (LIF), що

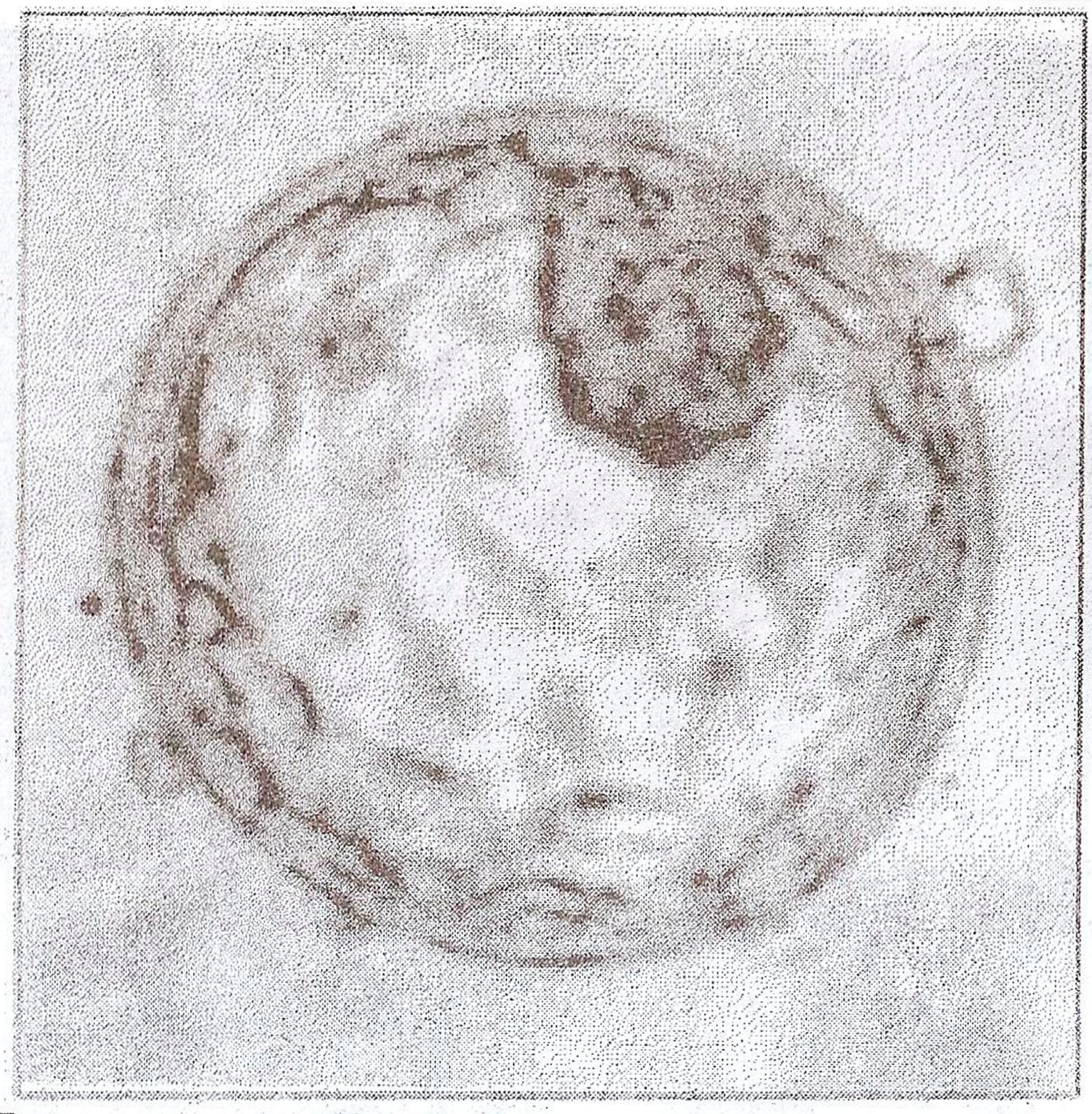


Рис. 6. Бластоцист людини

блокує диференціацію клітин, та застосуванню при вирощуванні шару згаданих вище допоміжних (фідерних) «годувальних» клітин мезенхімного походження (найчастіше з цією метою використовуються фетальні фібробласти перших трьох пасажів). Зараз ведуть розробку методів перетворення таких клітин на певну тканину з метою подальшої трансплантації. Раніше спроби вирощування диференційованих клітин людини і тварин в умовах двовимірної первинної культури на пластинці завжди призводили до незворотної дедиференціації і втрати корисних функцій гепатоцитами, нейронами, м'язовими клітинами. Лише недавно встановили, що соматичні клітини людини стабільно підтримують фенотип при щільності клітин у шарі культури 1 млрд/мл і при наявності ядра з мезенхімних клітин. Таку побудову функціональних одиниць органу можна отримати лише при використанні ембріональних стовбурових клітин (Рис.7).

Першим і головним джерелом сировини для отримання лабораторних соматичних клітин залишаються клони ембріональних стовбурових клітин, виділені з бластоцистів людини. Частину клонів, що найшвидше ростуть, переводять у лінію ембріональних стовбурових клітин. Потім починається багатоетапне диференціювання клітин у нейрони, кардіоміоцити, клітини кровотворення, епітелій тонкої кишки або епітелій ендокринних залоз та інші клітинні типи.

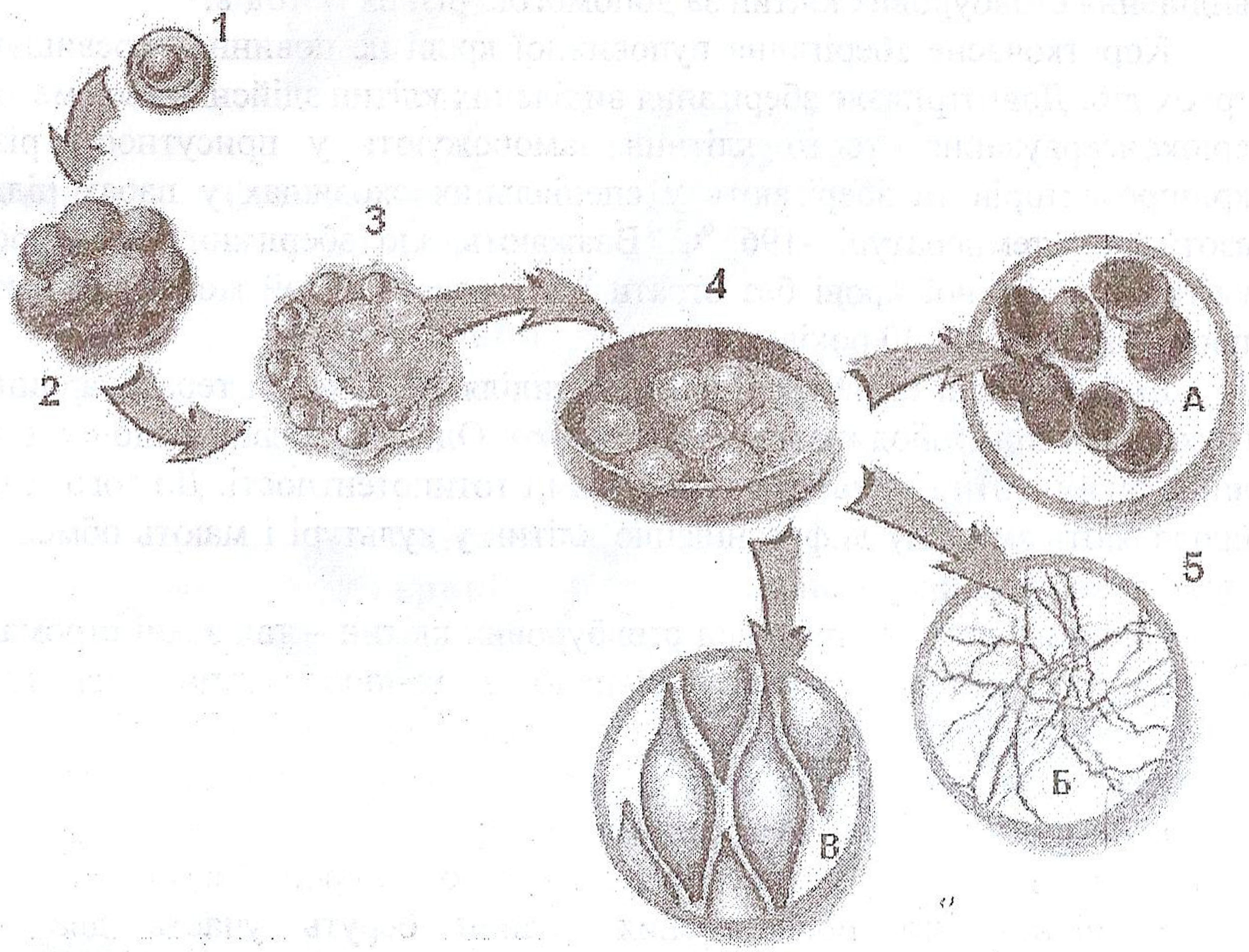


Рис. 7. Загальна схема культивування стовбурових клітин.

1. Яйцеклітина, переведена в умови in vitro; 2. Стадія бластоцисти (5-7 днів); 3. Внутрішня маса стовбурових клітин; 4. Культивовані недиференційовані стовбурові клітини; 5. Спеціалізовані клітини: А – клітини крові; Б – нервові клітини; В – м'язові клітини.

Друге джерело ембріональних стовбурових клітин – це статевий зачаток плодів (фетусів) 4-5-го тижня розвитку або статеві клітини.

Ще одне джерело - стовбурові клітини, що містяться в пуповинній крові, належать до гемопоетичних стовбурових клітин (клітин-попередників кровотворення), які походять з мезодерми. Ці клітини не тотипотентні, але мають риси плюрипотентності, тобто вони низькодиференційовані та менш імунореактивні в порівнянні зі спеціалізованими клітинами дорослого організму. Тому при пересадці пуповинної крові реакція несумісності за лейкоцитарними антигенами людини (HLA-система), яка є однією з головних причин реакції трансплантату проти хазяїна, трапляється значно рідше, ніж при пересадці кісткового мозку.

Отримання стовбурових клітин у цьому випадку складається з двох послідовних етапів – отримання та виділення. Пуповинну кров беруть після народження дитини. Для цього використовують контейнери зі

спеціальними консервантами та антикоагулянтами. Наступний етап – виділення стовбурових клітин за допомогою різних методів.

Короткочасне зберігання пуповинної крові не повинне перевищувати трьох діб. Довготривале зберігання виділених клітин здійснюється методом кріоконсервування, тобто клітини заморожують у присутності різних кріопротекторів та зберігають у спеціальних сховищах у парах рідкого азоту при температурі -196 °С. Вважають, що зберігання стовбурових клітин пуповинної крові без втрати їхніх властивостей може відбуватися протягом не менш 30 років.

Ембріональні стовбурові клітини виділяють також з тератокарциноми (пухлинної лінії) людини та миші *in vitro*. Однак суттєвий недолік деяких ліній таких клітин – швидка втрата ними тотипотентності. До того ж вони проявляють змішану диференціацію клітин у культурі і мають обмеження щодо використання у клініці.

Відомий ще один різновид стовбурових клітин – так звані стромальні клітини кісткового мозку. Порівняно з гемопоетичними клітинами, стромальних стовбурових клітин у кістковому мозку зовсім небагато, і вони являють собою складніші системи-довгожительки, які оновлюються досить рідко. Як показали останні дослідження, стромальні клітини, так само як і попередники клітин крові, постійно циркулюють у кровотоку ссавців.

У відновленні пошкоджених тканин беруть участь два види стовбурових клітин – спеціалізовані тканинні й універсальні стромальні клітини кісткового мозку. При цьому, якщо тканинні стовбурові клітини використовуються для відновлення пошкоджених ділянок тільки у даному місці і для певного виду тканини (кісткові – для кісток, м'язові – для м'язів, тощо), то стромальні стовбурові клітини кісткового мозку універсальні. Вони потрапляють з кровотоком до пошкодженого органу або тканини й на місці під впливом різних сигнальних речовин перетворюються на потрібні спеціалізовані клітини, які заміщують загиблі клітини.

Стромальні стовбурові клітини кісткового мозку, як і інші стовбурові клітини, здатні перетворюватися на багато інших клітин організму – хрящові (хондроцити), жирові (адипоцити), кісткові (остеобласти). При цьому здатність до таких перетворень у них зберігається і при вирощуванні колонії з однієї-єдиної стромальної клітини. Таким чином, існує принципова можливість виростити велику кількість стромальних клітин, а потім за допомогою спеціальних сигнальних речовин спрямувати їх для відновлення пошкоджених тканин (Рис. 8.).

На шляху до впровадження в трансплантологічну практику технології ембріональних стовбурових клітин зараз існує ряд перешкод, і перша з них – проблема джерела самих цих клітин. На сьогодні головне джерело їх – абортивний матеріал і залишок від матеріалу, застосовуваного при штуч-

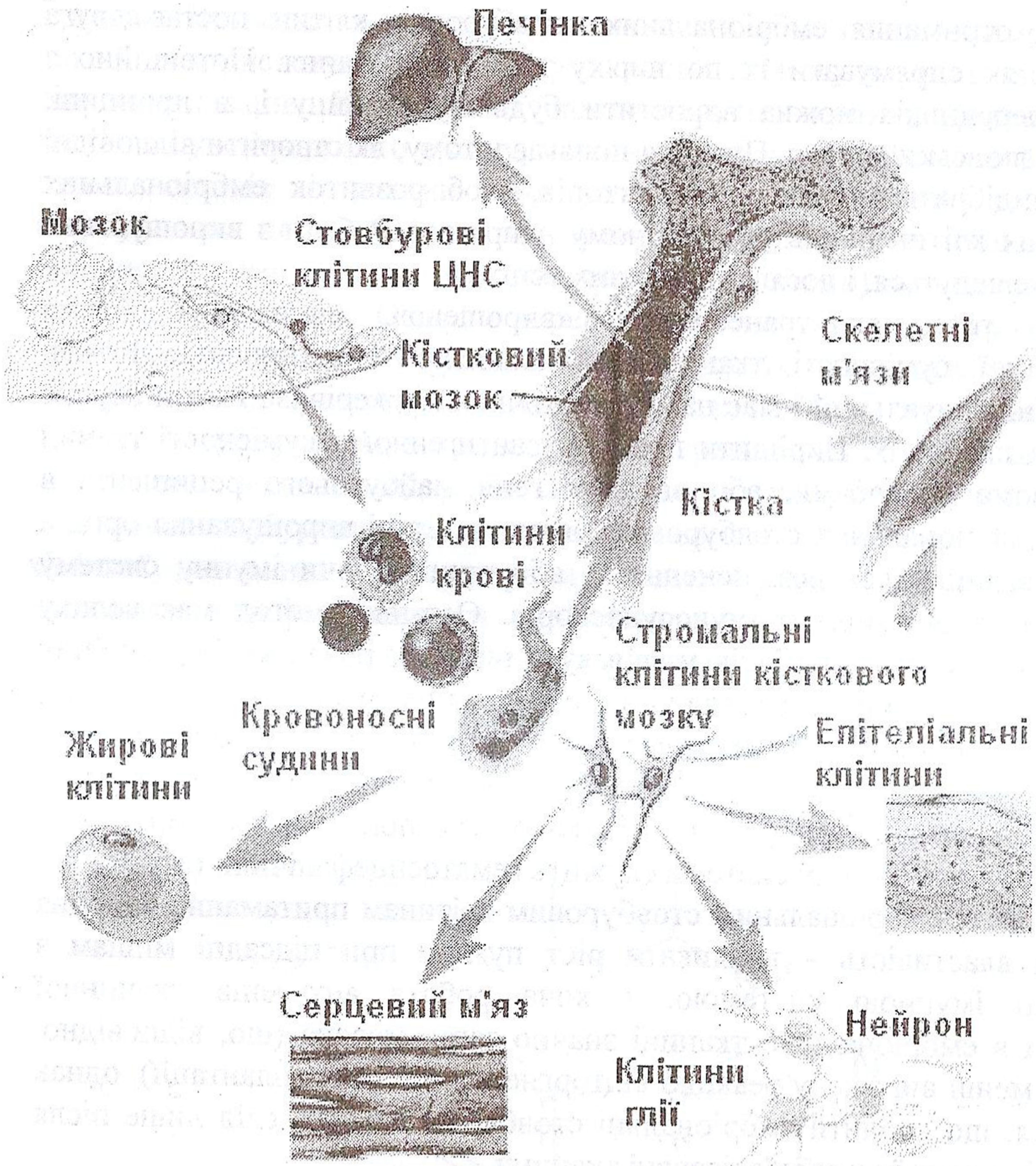


Рис. 8. Шляхи перетворень стромальних стовбурових клітин кісткового мозку

ному запліднені. Церква, релігійні общини, різні громадські організації, виходячи з біоетичних міркувань, закликають разом з абортами заборонити й дослідження ембріональних стовбурових клітин. У зв'язку з цим у багатьох країнах проекти, що стосуються ембріональних стовбурових клітин, сьогодні заморожено. Другий варіант передбачає безкінечне клонування клітинної лінії нащадків єдиної ембріональної стовбурової клітини, яка вже є в розпорядженні дослідників і яка, як зазначалося вище, здатна до необмеженої кількості поділів. Однак генетичні мутації, що виникають час від часу в ембріональних стовбурових клітинах, передаватимуться дочірнім клітинам і накопичуватимуться в наступних клітинних поколіннях.

Після отримання ембріональних стовбурових клітин постає друга проблема: як спрямувати їх по шляху диференціювання. Потенційно з клітин-попередників можна виростити будь-яку тканину і, в принципі, будь-який людський орган. Питання полягає у тому, як створити відповідні умови і підібрати поєднання індукторів, щоб розвиток ембріональних стовбурових клітин пішов у потрібному напрямку. Роботи з вирощування органів вже ведуться, і досягнуто певних успіхів.

Після того, як трансплантат «вирощено», виникає проблема імунологічної сумісності тканин трансплантата й реципієнта. Кожен організм індивідуальний і має набір генетичних маркерів, за якими імунна система розпізнає їх. Вирішити проблему антигенної несумісності тканин можна двома способами: або вводячи гени майбутнього реципієнта в культуру ембріональних стовбурових клітин на етапі вирощування органа (що досі залишається нездійсненним), або пригнічуючи імунну систему реципієнта за допомогою імуносупресорів. Останній метод має велику кількість негативних наслідків у зв'язку з ризиком розвитку інфекційних ускладнень та пухлиноутворення і не гарантує приживлення трансплантата. Існує й третій варіант – пересадка трансплантата, який гарантовано не контактуватиме з імунною системою реципієнта, наприклад, при нейротрансплантації, яка успішно здійснюється при хворобі Паркінсона (перешкодою для імунної системи служить гематоенцефалічний бар'єр).

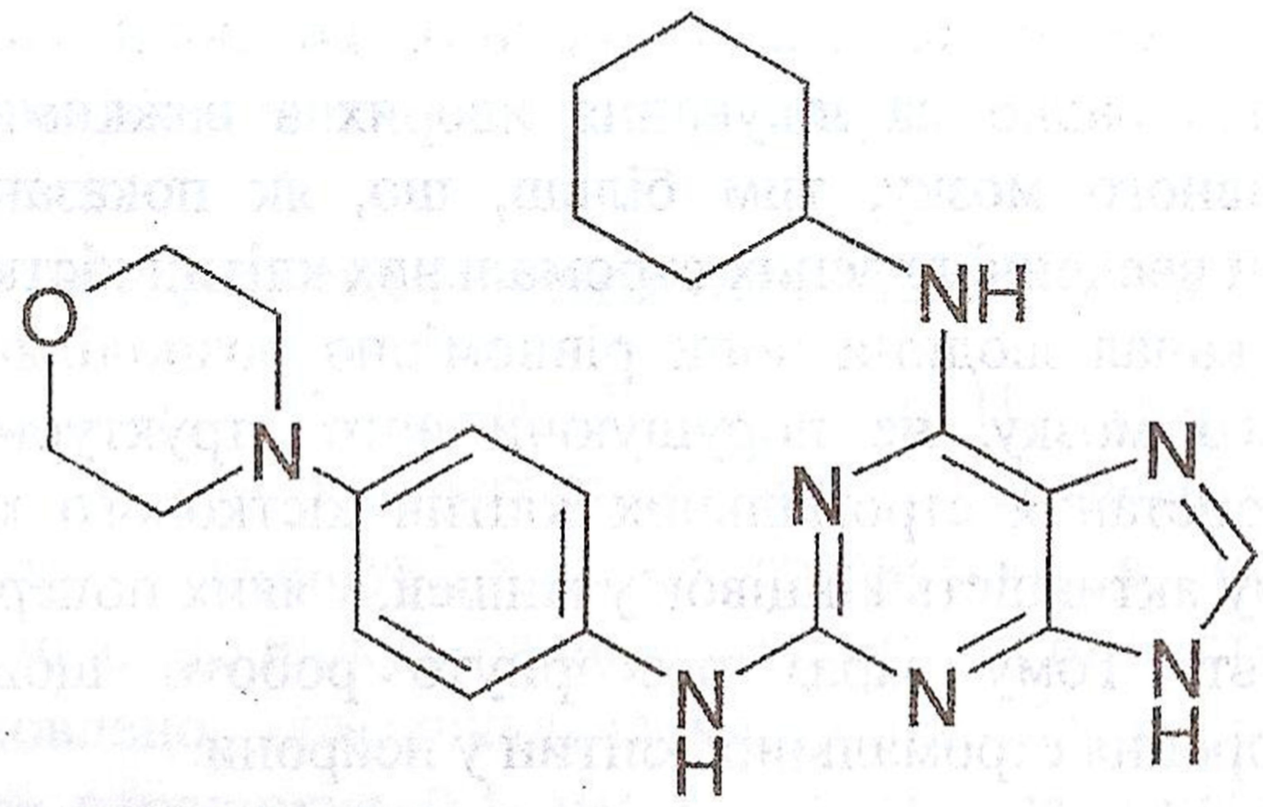
Крім того, ембріональним стовбуровим клітинам притаманна ще одна негативна властивість – викликати ріст пухлин при підсадці мишам з дефектною імунною системою. І хоча робота антигенів тканинної сумісності в ембріональній тканині значно загальмована (що, відповідно, даватиме менш виражену реакцію відторгнення при трансплантації), однак вважається, що вводити ембріональні стовбурові клітини слід лише після диференціювання їх у спеціалізовані тканини.

Можливо, замість того щоб витрачати зусилля на виділення, культивування та введення в організм стовбурових клітин хворого, варто мобілізувати приховані можливості самого організму. З'являється все більше даних про те, що стовбурові клітини, аналогічно до клітин злоякісних пухлин, сприймають хімічні сигнали, які направляють їх до тих місць, де виникли пошкодження. Так, в лабораторних дослідах показано, що за сигналом білку IGF-1 (інсуліноподібний фактор росту 1) мишачі стовбурові клітини направляються в тривалі «подорожі» по організму тварини. Тому зараз досконало вивчають роль хімічних сигналів та можливість практичного використання їх для запуску процесів регенерації за допомогою стовбурових клітин.

Останнім часом увагу дослідників привернули клітини дещо іншого типу – так звані *регіональні стовбурові клітини*, знайдені майже в усіх

органах. Визначають і виділяють такі клітини за певними маркерами, а також використовують особливості росту їх в культурі і здатність до диференціювання. Встановлено, що багато з них здатні диференціюватися не тільки у клітини того органу, у якому вони знаходяться, але й у клітини інших органів і тканин. До основних властивостей регіональних стовбурових клітин відносять плюрипотентність та обмежений (у порівнянні з ембріональними стовбурними клітинами) потенціал до поділу та диференціювання. Основні переваги регіональних стовбурових клітин перед ембріональними полягають у тому, що їх при необхідності можна використати як аутогенний клітинний матеріал. Тому не виникає ніяких імунологічних проблем, а також етичних перешкод щодо їх використання.

Зовсім недавно відкрито новий механізм дедиференціювання й отримання стовбурових клітин з дорослих соматичних клітин за допомогою хімічної речовини – міореверсину. Використання цієї речовини вже дозволило дедиференціювати міобласти скелету. Зараз цей напрямок досліджень вважається надзвичайно перспективним, оскільки обіцяє надати можливість одержати стовбурові плюрипотентні клітини практично з будь-якої людської тканини з наступним їх диференціюванням у клітини потрібного органу.



2-(4-морфоліноаніліно)-6-циклогексиламіно-пурин (міореверсин)

Слід відмітити, що стовбурові клітини й клітинна медицина – це загалом перспектива майбутнього, можливо, досить віддаленого. На шляху впровадження їх лежить велика кількість невирішених питань не тільки наукового та методичного, але й етичного характеру. Є тільки невеликий перелік захворювань, при якому лікування стовбурними клітинами показане й існує достатній клінічний досвід, що дає змогу досягти дійсно хороших результатів, не піддаючи хворого небезпеці.

У 1988 р. у Франції виконано першу трансплантацію з використанням пуповинної крові. Відтоді в світі було проведено біля тисячі пересадок

гемопоетичних стовбурових клітин, з них 60 % – з приводу злоякісних захворювань крові, 6 % – з приводу нейробластоми і 34 % – з приводу незлоякісних захворювань.

У випадках важких пошкоджень організмові не досить своїх власних стромальних клітин. Йому можна допомогти, вводячи стромальні клітини іззовні. Так, зокрема, показано, що введення стромальних клітин кісткового мозку у зону пошкодження серцевого м'яза (зону інфаркту) практично повністю знімає явища післяінфарктної серцевої недостатності у експериментальних тварин. Подібна клітинна терапія для відновлення пошкоджень серцевого м'яза надзвичайно перспективна, оскільки для неї використовують власні стовбурові стромальні клітини організму. Вони не підлягають відторгненню; крім того, при введенні дорослих стовбурових клітин виключено вірогідність злоякісного їх переродження.

У цьому плані ведуться успішні клінічні дослідження й інших стовбурових клітин. Так, недавно показано, що введення власних стовбурових клітин м'язевої тканини (міобластів), отриманих з м'язів стегна пацієнта-інфарктника, безпосередньо в зону інфаркту значно покращило здатність серця до скорочень.

Стромальні клітини під впливом певних факторів можуть перетворюватися навіть у нервові клітини (нейрони). Ці поки що лабораторні дослідження дають надію на лікування хворих з важкими ураженнями спинного й головного мозку, тим більш, що, як показано у багатьох дослідженнях, при введенні власних стромальних клітин кісткового мозку у спинномозковий канал людини вони рівномірно розподіляються по всіх відділах головного мозку, не порушуючи його структури. Недавно за допомогою використання стромальних клітин кісткового мозку вдалося відновити рушійну активність кінцівок у мишей, у яких попередньо штучно викликали інсульт. Тому зараз розгорнуто роботи щодо вирішення проблеми перетворення стромальних клітин у нейрони.

Стромальні клітини можна перетворити і на клітини печінки. Встановлено, що при пошкодженні печінки нові печінкові клітини (гепатоцити) та їхні попередники формуються головним чином з донорських стромальних клітин кісткового мозку.

Терапія стромальними клітинами вже з успіхом випробується в ортопедії при лікуванні складних переломів кісток.

Зараз у всьому світі проводять величезну кількість досліджень у галузі клітинних технологій. Наслідки цих досліджень можуть дати дуже багато. Клінічні випробування дають результати, про які при деяких захворюваннях лікарі й мріяти не могли, а хворим не полишали будь-якої надії.

Зрозуміло, що багато людей вже зараз хочуть скористуватися цими можливостями. Наприклад, після пологів у новонароджених немовлят

багатьох батьків у США і Європі вже з 1992 р. збирають та зберігають стовбурові клітини пуповинної крові. Такі клітини в принципі можуть стати своєрідною страховкою від багатьох хвороб на час довгого та щасливого життя. Пацієнти звертаються до клінік, які обіцяють «вилікувати всі хвороби» стовбурними клітинами, відвідують косметологів, які "омолоджують" клієнтів стовбурними клітинами. Але завжди слід брати до уваги, що:

1. клінічного досвіду використання стовбурових клітин надзвичайно мало (за виключенням банків кісткового мозку та гематологічних центрів);

2. не вирішено ряд питань щодо віддалених наслідків такої терапії;

3. при дії стовбурових клітин на організм існує ризик канцерогенезу;

4. при терапії стовбурними клітинами існує загроза інфікування, оскільки не завжди відомо, де, як і від кого отримано "клітинний препарат" та чи тестувався він на інфекційну безпеку;

5. існує ризик імуногенності клітинного препарату.

На даному етапі дослідження стовбурових клітин вже породило багато питань, і, на жаль, не на всі з них отримано відповіді. Але результати перших спроб застосування дорослих стовбурових клітин для лікування серцево-судинних хвороб досить обнадійливі. Тому слід сподіватися, що бурхливий прогрес у цій новій і надзвичайно перспективній галузі медичної технології забезпечить успішне подолання вказаних проблем. А регенеративній терапії на рівні клітин та органів пророкують велике майбутнє.

2.3. Культури рослинних тканин та клітин

У 1934-1939 рр. Ф. Уайт, Р. Коте та П. Нобко відкрили явище необмеженого росту в лабораторних умовах кореневої системи рослин і рослинних клітин у культурі, а також органогенез в умовах *in vitro*. При цьому встановили, що інокульовані корені ніколи не містять вірусу. У 1949 р. було встановлено, що апікальна меристема (невелике місце на кінці стебла, що не перевищує 0,1 мм і складається з недиференційованих клітин; це місце постійно росте і утворює органи рослин) практично не містить вірусів. Було виявлено, що насіння, отримане від зараженої рослини, також не містить вірусів. Ці факти, що пізніше привели до використання культур паростків меристеми для усунення вірусів, стали основою сучасної технології отримання безвірусних рослин.

Метод культур тканин або мікророзмноження *in vitro* винятково зручні для швидкого розмноження і зберігання здорових рослин. З цією метою відбирають відповідні рослини і піддають їх стерилізації з наступним перенесенням на відповідне живильне середовище. Можливість використати методи клонального мікророзмноження в стерильній культурі показано зараз для 440 видів рослин, які належать до 82 родин.

Кількість відібраних для культивування рослин-*експлантів* залежить від виду й фази розвитку рослини, органу, з якого взято експлант, пори року. Подальше культивування рослинних культур здійснюють із застосуванням спеціальних мікропористих поліпропіленових мембран, оброблених спеціальною поверхнево-активною речовиною, щоб покращити проходження поживних речовин. Ця методика суттєво прискорює ріст рослин порівняно з класичною методикою, що використовує агаризоване середовище. Раніше для виведення нового сорту було потрібно 10–30 років, тепер же, завдяки вживанню методів культивування тканин цей час скорочено до декількох місяців.

Мікроклональне розмноження – це безстатеве вегетативне розмноження, в результаті якого одержують генетично ідентичні форми, яке забезпечує збереження генетично однорідного посадкового матеріалу. У виробничих умовах цей метод широко застосовується, в тому числі і в Україні, зокрема для оздоровлення та швидкого клонального розмноження такого матеріалу.

У порівнянні з традиційними методами розмноження, які використовуються в сільськогосподарській практиці, мікроклональне розмноження в культурі дає ряд переваг:

Коефіцієнт розмноження вищий, ніж при звичайних методах розмноження. Так, з однієї рослини гербери методом традиційної селекції за рік можна одержати 50-100 рослин, а при розмноженні через культуру – до 1 млн; з однієї верхівки яблуні за 8 місяців культивування можна одержати 60 тис. рослин;

Можна підтримувати ріст цілий рік;

Тисячі рослин можуть рости на невеликій лабораторній площі;

Разом із розмноженням часто провадять оздоровлення рослин від вірусів і патогенів;

Цим методом можна отримувати рослини, які важко або зовсім не розмножуються вегетативно, як, наприклад, пальма.

Мікроклональне розмноження добре проводиться з картоплею, капустою, часником, томатом, цукровим буряком; серед ягідних культур найбільших успіхів досягли для суниці, серед декоративних культур – для ірису, гіацинту, фрезії, гладіолусу, лілії, орхідей, гвоздики, нарцисів, тюльпанів, гербери.

Культура клітин рослин з лабораторного об'єкту перетворилася на теоретичну і технологічну основу нової галузі промисловості – біотехнології рослин. З огляду на те, що тільки рослини є джерелом багатьох важливих речовин, а запаси рослинної сировини в природі виснажуються, неважко уявити місце клітинних технологій у майбутньому.

Річ у тім, що культивовані культури, як правило, здатні до синтезу вторинних сполук, притаманних тому видові рослин, з яких вони виділені.

Цим методом можна отримати алкалоїди, глікозиди, фенольні сполуки, ефірні олії, фітогормони, такі, наприклад, як дигітонін, хінін, кодеїн, аймалін, вінбластін, вінкристин, берберин.

У залежності від використовуваних рослинних клітин і тканин, а також способів культивування розрізняють наступні основні типи структур: калюсні, суспензійні, протопластів, меристематичні, пиляків.

Калюсні структури. У культурі тканин певного виду рослин у результаті поділу диференційованих клітин виникають недиференційовані вакуолізовані клітини, що ростуть хаотично, утворюючи клітинну масу – так званий *калюс* (в перекладі з латинської – мозоля). Ця тканина формується не тільки в пробірці, але й у природних умовах при пораненні рослин і сприяє їх загоюванню. Складається вона з більш-менш однорідних паренхімних клітин, початок яким дає меристема рани. Калюс утворюється на живильних середовищах, що містять мінеральні й органічні поживні речовини, вітаміни, цукроспирти, ауксини, а іноді й цитокініни (Рис. 9).

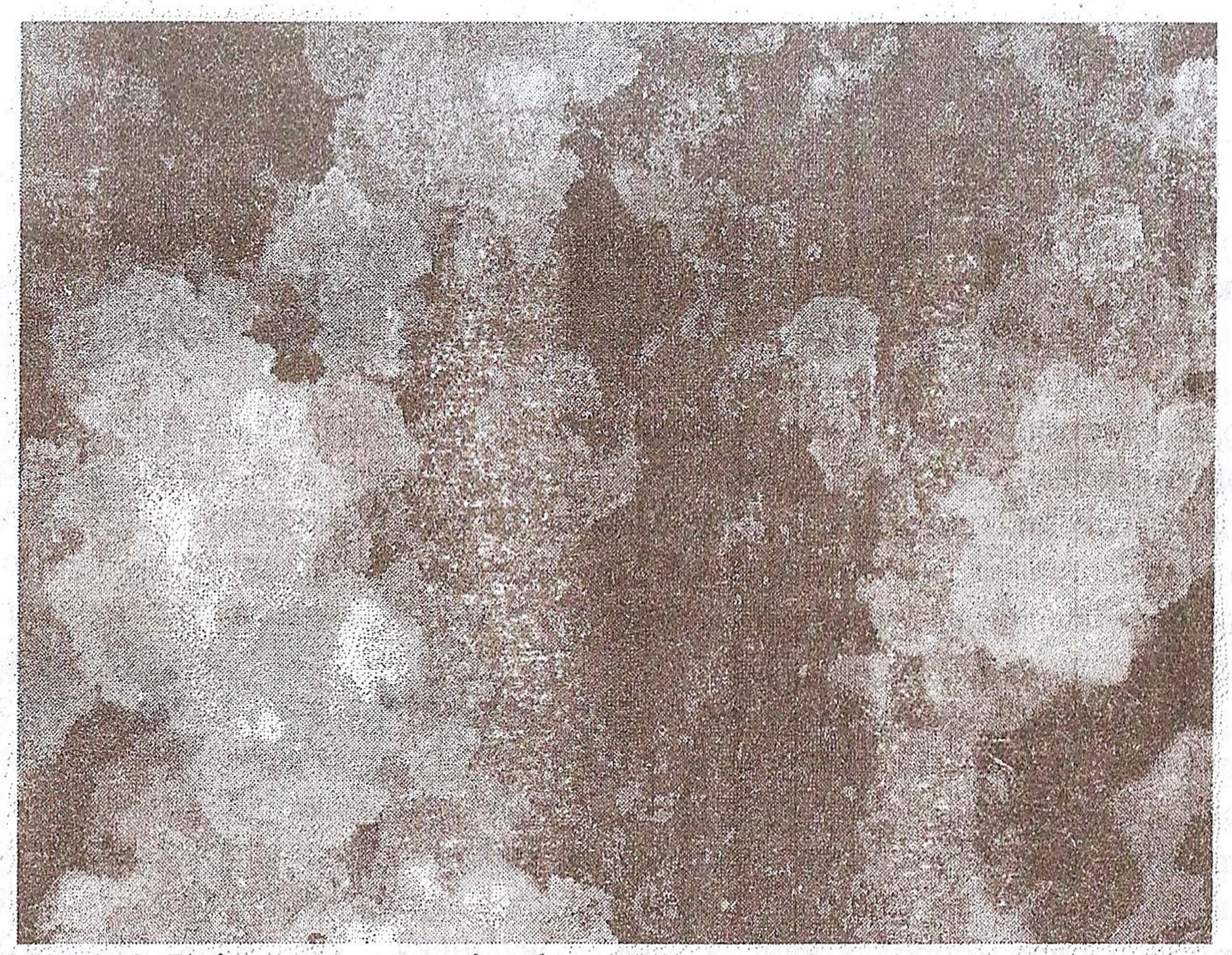


Рис. 9. Клітини калюсу під мікроскопом

Для калюсних структур вихідним матеріалом є калюс. Елементи калюсу мало диференційовані, однак поблизу його поверхні спостерігається ріст, обумовлений активністю меристематичних клітин. У подальшому в

калюсі можливе диференціювання його елементів та утворення *флоеми, ксилеми* та інших тканин. Зовнішні клітини калюса набувають структури корку.

Для культивування на відібраному органі роблять надріз, на всій поверхні якого розвивається тканина, що складається з клітин, які ростуть хаотично. Ця утворена тканина й культивується в заданих умовах.

Культивування калюсу на твердих середовищах здійснюють на різному механізованому устаткуванні. Апарат для культивування клітин являє собою вертикальну ємність циліндричної форми з конічним дном, сорочкою і змійовиками для охолодження культури, розділену усередині перфорованими пластинами. Процес отримання клітин у такий спосіб потребує використання досить великих площ, не гарантує стерильності, і до того ж має відносно низьку продуктивність. У залежності від виду рослини і поставленої мети попередньо необхідно встановити склад поживних середовищ та концентрації фітогормонів, потрібних для оптимального росту. Калюси можуть дуже відрізнятися на вигляд. Вони бувають рихлі або щільні. Забарвлення калюсу дає змогу судити про утворення вторинних речовин. Якщо калюс тримати у повній темряві, він білувато-жовтий. На світлі він утворює хлорофіл і стає зеленим. Червоне світло вказує на наявність *антоціану* та *бетаціану*. Щоб послабити або усунути ці впливи, у живильне середовище додають полівінілпіролідон, глутатіон або аскорбінову кислоту. Коричневі клітини утворюються перед відмиранням, тому таку тканину необхідно помістити у свіже середовище.

При довгочасному культивуванні калюси можуть втрачати свій морфогенетичний потенціал. Після декількох змін живильних середовищ і при додаванні ростових гормонів калюс диференціює і регенерує, утворює осьові пагони, корені і, нарешті, повністю всю рослину, здатну до розмноження та вирощування в ґрунті. Однак здебільшого калюси використовуються як вихідний матеріал для клітинного або суспензійного культивування.

Рослини, регенеровані з калюсу, часто відрізняються від своїх батьків за кількістю хромосом. Зміни, що спостерігаються в ізольованій культурі, можуть виникати внаслідок мутацій специфічних генів та хромосомних перебудов. Для селекції генетична мінливість клітин калюсу може становити певний інтерес. Так, на основі регенерації в культурі тканин і органів рослин отримано високопродуктивні сорти соняшнику. На жаль, у таких найважливіших сільськогосподарських культур, як зернові та бобові, активувати морфогенез на живильних середовищах поки що вдається досить рідко, хоча останнім часом у цьому напрямку з'явилися певні досягнення.

Суспензійна культура. Клітини рослин можна культивувати і в рідких живильних середовищах (суспензійні культури), що дає змогу впливати на

метаболізм і ріст популяцій за допомогою екзогенних факторів. У цьому разі використовують лінії клітин рослин, які відповідають таким умовам: схильність до розмноження в дезінтегрованому стані, морфологічна "вирівняність", задовільна швидкість розмноження, збереження шляхів метаболізму. Такі клітинні лінії уподібнюються одноклітинним мікроорганізмам і можуть називатися "суспензійними культурами" у разі вирощування їх на рідких живильних середовищах. При цьому склад і реологічні характеристики середовищ належать до головних факторів, що визначають перебування поодиноких або агрегованих клітин у стані завису. Щодо морфологічної "вирівняності" клітин, то йдеться про їхню округлу або сферичну форму, ущільнену цитоплазму та порівняно невеликі розміри (у середньому 10-50 мкм). Поодинокі рослинні клітини в цьому разі нагадують одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми; їхні ростові характеристики (фази розмноження) у деякому наближенні теж збігаються (lag-фаза, log-фаза, const-фаза), хоча часові інтервали поміж фазами для рослинних клітин довші.

Для суспензійних культур вихідним матеріалом можуть бути як ізольовані цілі клітини відібраного органу рослини, так і подрібнений калюс. Утворені клітини вміщають у рідке живильне середовище та культивують при постійному переміщуванні. Ріст суспензійної культури відбувається у багатьох випадках суттєво швидше, ніж калюсної культури, оскільки скупчення клітин поглинають поживні речовини значно більшою загальною поверхнею, а у калюса це відбувається лише у тій його частині, яка лежить на субстраті. При цьому відбувається поділ клітин, нові клітини не відділяються, і їхні скупчення збільшується. За допомогою особливих прийомів суспензійну культуру можна перенести на тверде живильне середовище. Тут з клітин або комплексів клітин може утворитися здатний до життя калюс. У суспензії можуть виникнути також і зародки, які після перенесення їх на агар утворюють нову рослину.

Швидкість розмноження рослинних клітин невелика. Час подвоєння їхньої кількості становить 1–3 доби, і тому за даним показником вони суттєво поступаються, наприклад, бактерійним та дріжджовим клітинам, час подвоєння яких у глибинних умовах не перевищує для більшості видів 20–30 хв. Проте, переводячи культуру рослинних клітин на хемостатне (безперервне) вирощування, можна досягти високої їх продуктивності за біомасою або за вторинними метаболітами. Початкові клітинні суспензії зазвичай отримують з калюсних тканин, підданих обробці пектиназою та полігалактуроназою. При цьому умови вирощування підтримують або в періодичному, або в безперервному режимі.

Вирощуючи клітини в суспензійних культурах, важливо зберегти притаманні їм особливості обміну. Більш того, регулюючи обмін, можна досягти помітного підвищення виходу потрібних продуктів. За цих умов

увагу приділяють типові диференціації, або станові спеціалізації вихідних клітин, оскільки від нього залежить видоспецифічність первинного та вторинного метаболізму.

Суспензійні культури зазвичай вирощують у відповідних місткостях після фільтрації первинної суспензії через стерильні металеві, нейлонові або марлеві сита, щоб звільнитись від великих агломератів клітин. Для культивування рослинних клітин в суспензії використовують колби Ерленмейера ємністю 250 мл. Рослинні клітини вирощують в апаратах роллерного типу з частотою обертання 100 об/хв. Для крупномасштабного культивування рослинних клітин використовують спеціальні металеві або скляні ферментери (біореактори) різної конструкції ємністю від 0,1 до 60м^3 та більше. Вирощування проводять на протязі 70 діб, здійснюючи мікробіологічний, біохімічний та візуальний контроль.

Аерацію культуральної рідини здійснюють стерильним повітрям через барботер. Повітря стерилізують, як правило, шляхом фільтрації на двох-трьох послідовно розташованих фільтрах. В процесі культивування клітин регулюють температуру (25-37^{0}С), активну кислотність середовища і окислювально-відновний потенціал.

Основну увагу при нарощуванні біомаси в ферментерах приділяють процесу піногасіння. Основна причина появи великої кількості піни – висока в'язкість живильного середовища, обумовлена значним нагромадженням біомаси. Для боротьби з піною у ферментерах використовують різні поверхнево-активні речовини: рослинні олії (соєву, соняшникову), мінеральні олії (вазелінову, парафінову), спирти, жирні кислоти. Іноді з цією метою використовують спеціально синтезовані речовини (силікони, діазобутилкарбаміл тощо).

Як успішний приклад здійснення промислового вирощування рослинних клітин у глибинних умовах можна навести здійснений в Японії крупномасштабний процес вирощування вербозілля (*Lysimachia*) в умовах занурення, з метою отримання вторинного метаболіту – *шиконіну,* цінного фармацевтичного препарату та барвника.

Культура протопластів. В умовах *in vitro* вдається злити (поєднати) соматичні клітини рослин різних видів. З цією метою в клітинній інженерії рослин широко використовують *протопласти.* Протопласти – це клітини, позбавлені клітинної оболонки механічно або за допомогою ферментів. Така "гола" клітина надалі потенційно спроможна відновити клітинну оболонку, ділитися й утворювати клітинні агрегати, з яких надалі можна отримувати *рослини-регенеранти.* Відсутність клітинної стінки дає змогу виконати ряд генетичних маніпуляцій, пов'язаних з реконструюванням генома, а також одержати популяції гібридних клітин у результаті злиття протопластів, виділених з клітин мутантного походження (Рис. 10).

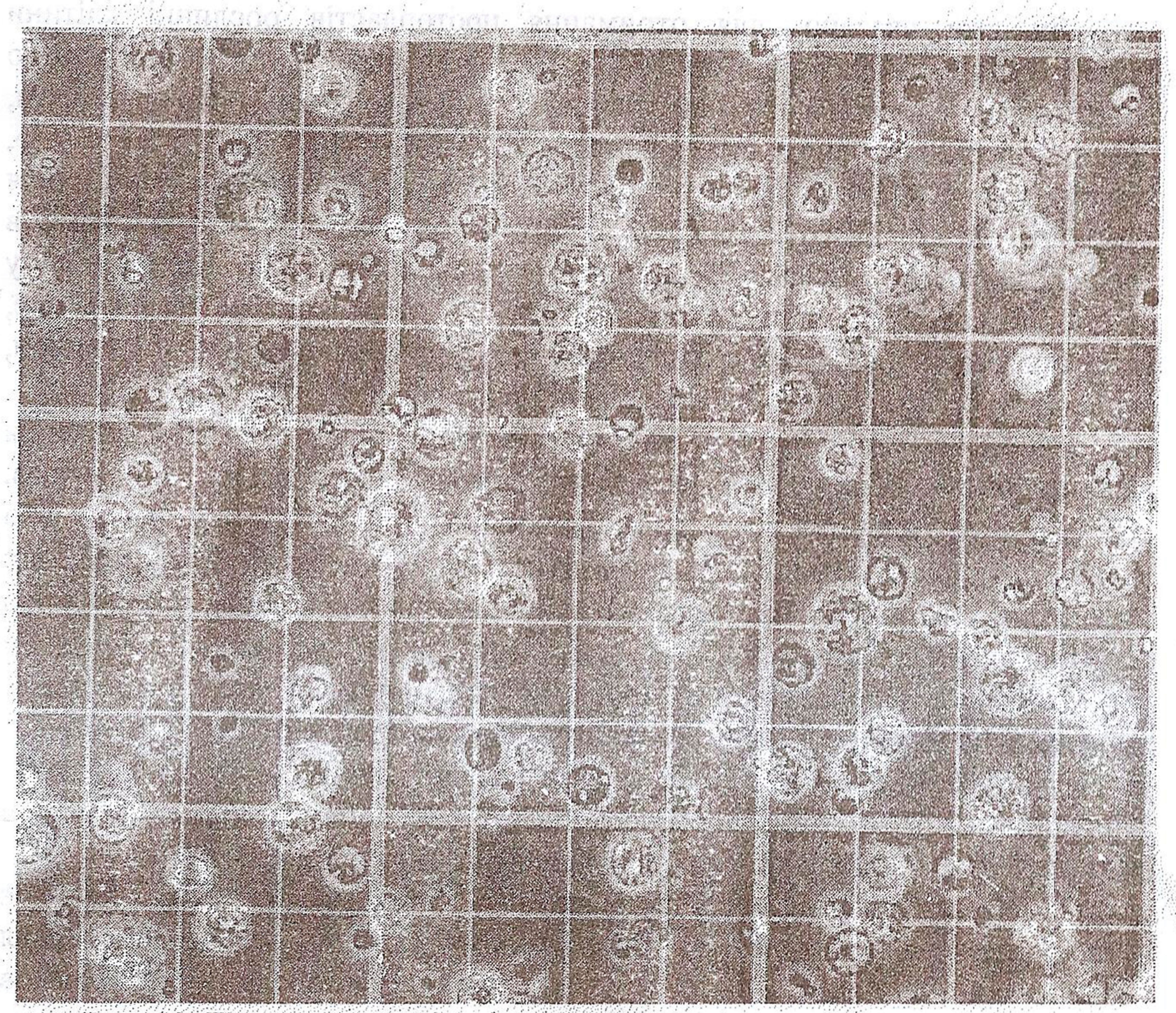


Рис. 10. Протопласти під мікроскопом

Протопласти рослин уперше отримали в 1971 р. у лабораторії А. Такебе. Для руйнування клітинної стінки звичайно застосовують ферментні препарати трьох видів – *целюлазу, гемоцелюлазу* та *пектиназу*. Щоб отримати життєздатні протопласти, необхідний також осмотичний стабілізатор. Такими стабілізаторами бувають цукри (глюкоза, сахароза, ксилоза, сорбіт, маніт) або розчини деяких солей. Крім осмотичних параметрів середовища, мають бути також підібрані pH, освітлення, температура та інші фактори.

Культури протопластів отримують, головним чином, з виготовленої суспензії, отриманої з мезофілу, обробляючи її ферментами, що руйнують клітинні стінки. В результаті може відбутися приєднання чужих органел, а також чужої ДНК, яка вбудовується в генетичний матеріал ядра; результатом може стати синтез (експресія) певних продуктів. Оскільки поверхні протопластів мають від'ємний заряд, необхідно нейтралізувати відштовхування їх один від одного, після чого вони поєднаються.

Як вже вказано, для отримання протопластів рослинні клітини заздалегідь звільняють від оболонок. Цього можна досягти за допомогою плазмолізу і подальшого нарізування тканини. Згідно із цим методом, рослинні тканини знаходяться у гіпертонічному середовищі до тих пір, поки протоплазма повністю не відокремиться від клітинної стінки, після чого клітини нарізають гострим лезом. Протоплазма, що при цьому в деяких випадках стискається, залишається непошкодженою. Коли нарізану у такий спосіб тканину знову занурюють у розбавлене середовище, протоплазма набухає і виходить за межі зруйнованої клітинної камери, внаслідок чого утворюється ізольований протопласт.

Найбільш поширеним є вищезазначений метод перетравлення клітинних стінок за допомогою суміші целюлаз, пектиназ та геміцелюлаз. Ці ферменти одержують в промислових масштабах із джгутикових або грибів у вигляді препаратів різного ступеню чистоти. Зрозуміло, що травлення клітинних стінок веде до руйнації живих протопластів. Частково це відбувається внаслідок того, що препарати ферментів забруднені протеазами і пероксидазами. Проте, ступінь пошкодження протопластів залежить не тільки від забруднення ферментних препаратів, їх концентрації і часу обробки, але і від видів рослин і типів тканин, які гідролізуються. Перспективним є отримання протопластів за допомогою плазмолізу в розчині сахарози, що сприяє їх подальшому відновленню.

Після припинення дії ферментів у протопластів знову починає утворюватися клітинна стінка. Вона виникає скоріше ніж за добу, після чого клітини починають ділитися і регенерують нові рослини. За цих умов досить важко досягти поділу утворюваних клітин, а ще важче отримати цілу рослину. Виділяють низку факторів, які визначають проліферативну здатність клітин, що виникають з ізольованих протопластів: 1) видова специфічність та фізіологічний стан тканини рослин; 2) спосіб і умови виділення протопластів; 3) щільність висіву протопластів; 4) склад живильного середовища (це стосується не лише гормональних і вітамінних домішок, а й концентрації мінеральних солей та pH).

Подальшу регенерацію рослин з протопластів здійснюють або через ембріогенез, або через розвиток калюсу. Для цього протопласти культивують у середовищі, в якому вони можуть ділитися і формувати калюс, здатний до регенерації з утворенням цілої рослини. З використанням культури клітин і тканин вдається швидко розмножити новий сорт (якщо культуру у виробництву розмножують вегетативно) або лінію для виробництва гібридного насіння у городніх, декоративних та інших рослин (Рис. 11).

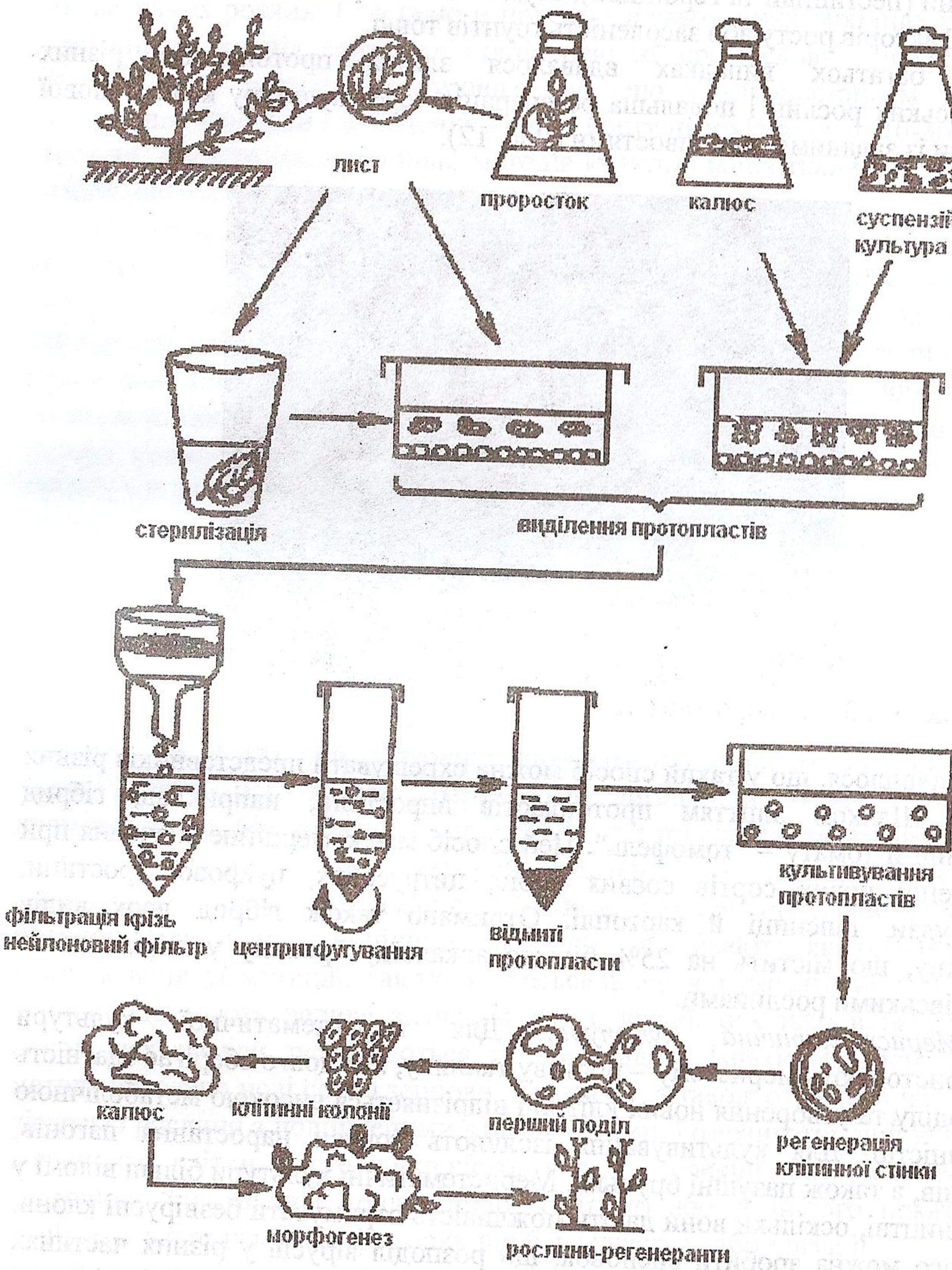


Рис. 11. Схема отримання рослин-регенерантів з протопластів

Освоєння техніки регенерації рослин з протопластів дає змогу зробити більш дієвою селекцію на рівні клітин. Якщо клітини обробити мутагеном і піддати дії якихось несприятливих умов, виживуть тільки мутанти, стійкі проти цих умов. Несприятливими факторами можуть бути токсичні

речовини (пестициди та гербіциди), збудники захворювань, низький вміст у ґрунті факторів росту або засоленість ґрунтів тощо.

У багатьох випадках вдавалося злиття протопластів різних батьківських рослин і подальша регенерація через культуру калюсу нової рослини із заданими властивостями (Рис. 12).



Рис. 12. Злиття протопластів

Виявилося, що у такий спосіб можна схрещувати представників різних видів. Шляхом злиттям протопластів виростили, наприклад, гібрид картоплі й томату – "томофель". Цей спосіб має комерційне значення при виведенні нових сортів соєвих бобів, цитрусових, цукрової тростини, кукурудзи, пшениці й картоплі. Отримано також гібрид двох видів дурману, що містить на 25% більше алкалоїду тропану у порівнянні з батьківськими рослинами.

Меристематична культура. Для меристематичної культури використовують меристему – ростову тканину, яка довго зберігає здатність до поділу та утворення нових клітин і відрізняється високою метаболічною активністю. Для культивування ізолюють конуси наростання пагонів, коренів, а також пазушні бруньки. Меристематичні культури більш відомі у садівництві, оскільки вони дають можливість отримувати безвірусні клони. З цього можна зробити висновок, що розподіл вірусів у різних частинах рослини нерівномірний, а меристема їх позбавлена. З безвірусної меристеми у великій кількості можуть регенерувати генетично тотожні безвірусні рослини. Цей спосіб використовують для виведення сортів картоплі, винограду, декоративних рослин, а також у лісництві.

За допомогою культивування меристеми, що гарантує безвірусність рослини, виведено нові сорти гвоздики, хризантеми, гербери та інших

декоративних рослин. Створено й нові сорти екзотичних орхідних рослин, виробництво клонів яких вже поставлено на промислову основу. Деякі сорти суниці, малини, цитрусових виведено з використанням техніки клонування. Раніш для виведення нового сорту необхідно було 10-30 років, зараз же, завдяки використанню методів культивування тканин, цей період скорочено до декількох місяців.

Культура пиляків. На живильних середовищах при високій інтенсивності освітлення нині вирощують рослини — *гаплоїди* з клітин пилку. У таких рослин вдвічі менше хромосом, ніж у звичайних соматичних клітинах стовбуру, листя або коренів батьківської рослини. Для отримання гаплоїдних рослин використовують культуру пиляків. Як правило, рослина диплоїдна, тобто в її клітинах міститься два гомологічних набори хромосом. Тільки зародкові клітини є гаплоїдні. Для отримання гаплоїдної культури найпридатніші нестиглі пиляки, у яких пилкові зерна (клітини) знаходяться ще в стадії, яка передує першому поділові мікроспор на вегетативні та генеративні зерна. Після переносу стерильних пиляків на живильне середовище пилкові клітини починають ділитися. Розвивається проміжний калюс або ж одразу утворюється гаплоїдний зародок, що пізніш диференціює в гаплоїдну рослину. Такі гаплоїдні рослини стерильні, але вони можуть перейти в диплоїди після дії колхіцину або злиття протопластів. З них при подвоєнні хромосом під впливом колхіцину або закису азоту під тиском отримують дигаплоїди (якщо головний хромосомний набір збільшено вдвічі) або ж тетраплоїди (коли цей набір зростає в чотири рази). Утворені рослини *гомозиготні* та стійко забезпечують прояв притаманних їм властивостей протягом багатьох поколінь. При цьому нові цінні ознаки у них не зникають, якщо, звичайно, в них не виникає мутацій. Так утворюються плодючі гомозиготні чисті лінії рослин, що мають велике значення для селекції, оскільки в наступних поколіннях завжди зустрічаються ті само задані ознаки. Завдяки цьому методу виведено нові сорти зернових і тютюну, а також отримано численні лікарські рослини з поліпшеними властивостями. Гомозиготні лінії культур рослинних клітин часто використовують у селекції на *гетерозис* – достовірне підвищення продуктивності, якості або ж іншого показника порівняно з батьківською формою, що бере участь у гібридизації.

Для культивування рослинних клітин використовують різноманітний набір поживних середовищ, як рідких, так і твердих (агаризованих). Культуру клітин для отримання деяких лікарських препаратів вирощують на середовищах, що містять солі, сахарозу, вітаміни (тіамін, нікотинову кислоту, піридоксин), агар-агар, кінетин, індол-3-оцтову кислоту, амінокислоти тощо).

Клітини деяких сільськогосподарських рослин вирощують у рідких поживних середовищах Мурасіга-Скуга (МС), Шенке-Хільдебрандта (ШХ),

Уайта. Вони виявилися ефективними для вирощування різних рослин. МС та ШХ вважають середовищами з високим вмістом солей (у порівнянні з низькосольовим середовищем Уайта). Середовище ШХ відрізняється від інших надзвичайно високим, десятиразовим, вмістом мезоінозиту.

Компоненти середовищ для вирощування калюсних і суспензійних культур можна розділити на шість груп, що зазвичай відтворює порядок при виготовленні вихідних концентрованих розчинів:

Основні неорганічні поживні речовини (мікроелементи) -

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$; Fe_2SO_4; $MgSO_4 \cdot 4H_2O$; $MoSO_4$; KCl; KJ та ін.;

Джерело заліза $Fe_2(SO_4)_3$;

Органічні добавки (вітаміни, амінокислоти, нікотинова кислота, тіамін, хлористоводнева кислота);

Джерела вуглецю (сахароза);

Регулятори росту рослин гібереліни, ауксини, цитокініни).

Зміна складу поживного середовища і інших параметрів культивування приводить до зміни не тільки кількісного, але і якісного складу продуктів біосинтезу рослини, у результаті чого можуть бути отримані зовсім нові біологічно активні сполуки з принципово іншим механізмом дії.

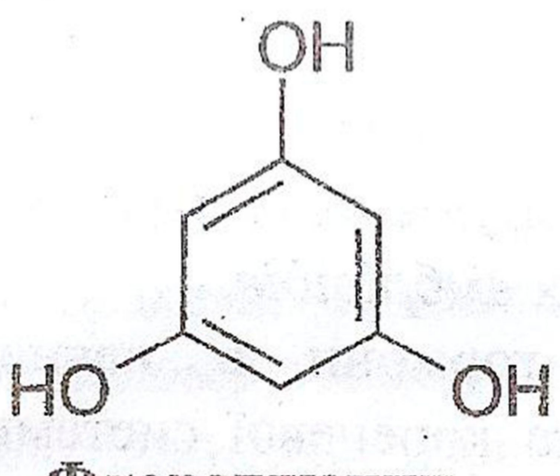
Щодо живильного середовища, яке використовується саме при клональному мікророзмноженні, то його властивості визначаються поставленою метою культивування рослинного матеріалу, оскільки від заданих умов залежать властивості кінцевого продукту. Оскільки ізольовані рослинні клітини і тканини переважно гетеротрофні, у середовищі має міститися органічно зв'язаний вуглець, джерелом якого звичайно служать глюкоза або сахароза. Азот додають у формі нітратів, що утилізуються клітинами за допомогою нітратредуктази. Необхідні компоненти середовища – це також вітаміни, особливо групи В (B_1, B_2, B_6), інозит, а також амінокислоти та органічні солі. До безумовно необхідних мікроелементів належать бор, марганець, йод, мідь, кобальт, молібден. Так, нестача марганцю перешкоджає синтезу білків, зменшує кількість РНК і призводить до збільшення вмісту вільних амінокислот. Залізо має значення для поділу ядра і для діяльності дихальних ферментів. Нарешті, у живильному середовищі необхідна присутність ряду фітогормонів.

Маніпулюючи концентраціями різних речовин у живильних середовищах, кислотністю середовищ, температурою, освітленістю і вологістю в камерах для культивування, можна одержати рослини й речовини з необхідними властивостями.

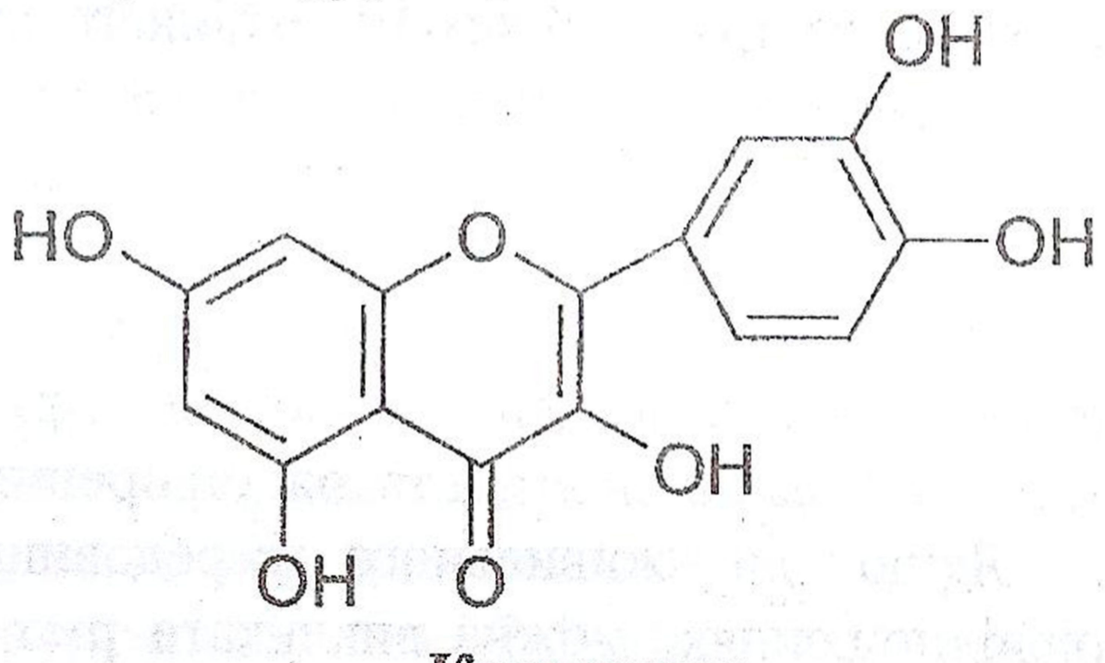
Відібраний для подальшого культивування матеріал стерилізується різними речовинами. При цьому необхідно проводити стерилізацію протягом певного часу, щоб, з одного боку, її тривалість забезпечила знищення мікроорганізмів, з іншого – не пошкодила б самі рослинні

клітини. Підготовка матеріалу до культивування завершується багаторазовим обмиванням стерильною водою, після чого його вміщують у стерильну робочу банку на живильне середовище і вирощують обов'язково в стерильних умовах.

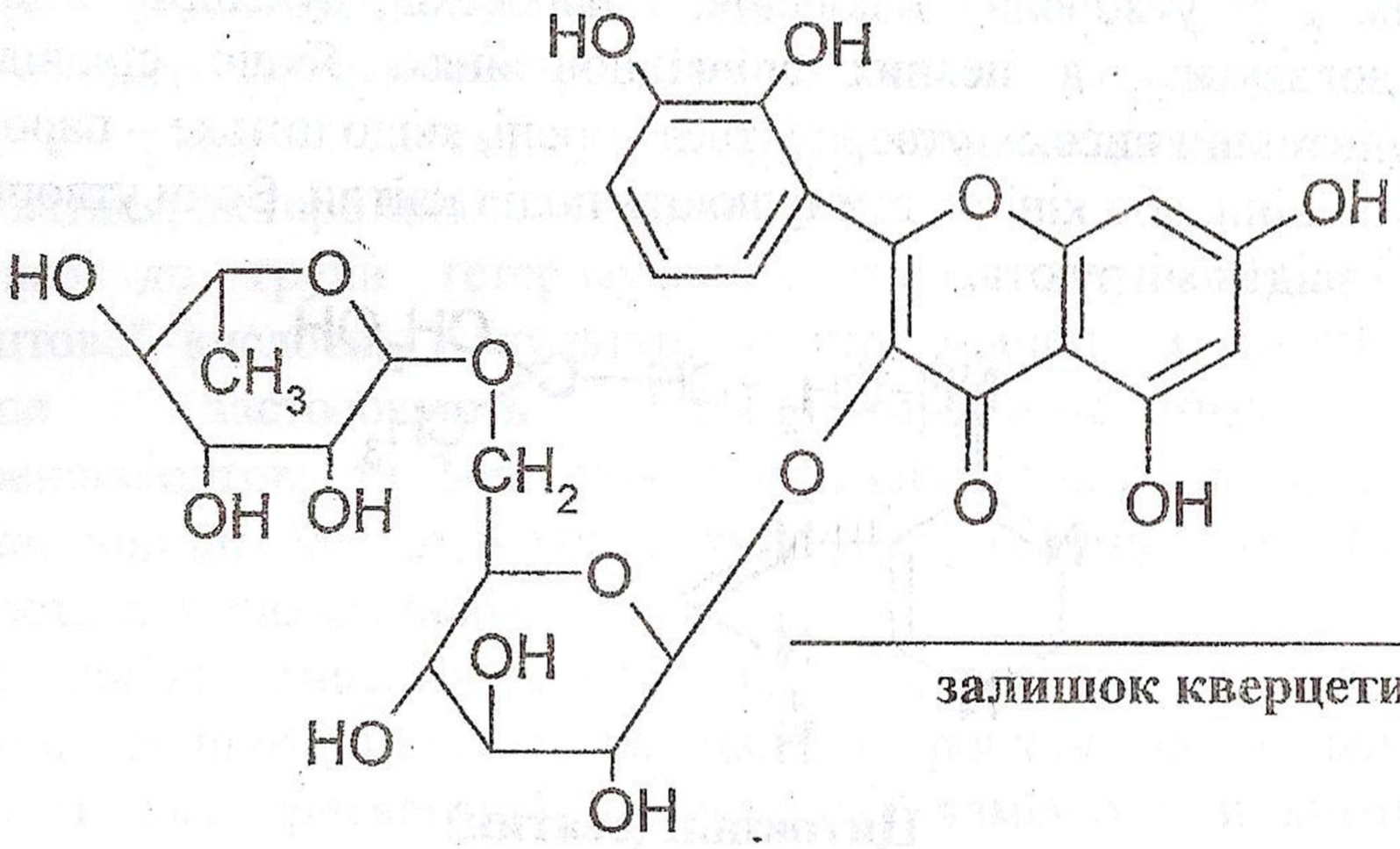
Мікрокультивування *in vitro* забезпечує швидке вегетативне розмноження багатьох видів рослин. При цьому важливе значення має стан *ювенільності* (від англійського *juvenile* – юнацький, юний), який зазвичай розтягується на кілька років і характеризується порівняною легкістю вегетативного розмноження. Для дерев відомо також явище *реювенільності*, коли деякі тканини дорослої рослини проявляють властивості паростків. Реювенілізовані тканини використовують для розмноження окремих видів покритонасінних (наприклад, евкаліптів) та голонасінних дерев (різні види сосни). Реювенілізація може прискорюватись під впливом окремих фенольних сполук (флороглюцин, кверцетин, рутин).



Флороглюцин



Кверцетин



залишок G-β-L-рамнозидо-D-глюкози

залишок кверцетину

Рутин

Ці сполуки впливають на регуляторні процеси, викликані впливом цитокінінів.

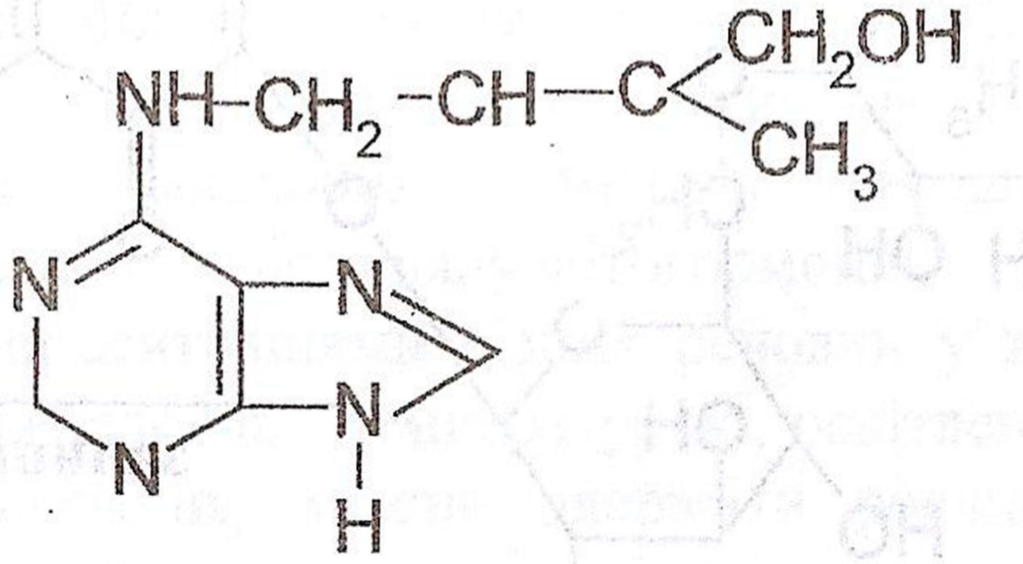
Дуже перспективними визнаються роботи, пов'язані з виробництвом лікарських і технічних речовин на основі культивування рослинних тканин; це особливо стосується речовин, яких не вдається синтезувати. Так, подібним способом вже одержують з клітинних барбарису ізохіноліновий алкалоїд барберин, а з женшеню – гінсеносид.

Вирощувані на штучних живильних середовищах клітини й тканини рослин стали основою різноманітних технологій у сільському господарстві. Одні з них спрямовані на отримання рослин, тотожних початковій формі; йдеться про оздоровлення та клональне мікророзмноження на основі меристемних культур, створення штучного насіння, кріозбереження генофонду при глибокому заморожуванні меристем і пилку. Інші методи застосовують для створення рослин, генетично відмінних від початкових, для полегшення й прискорення традиційного селекційного процесу або для створенням генетичної різноманітності й пошуку та відбору генотипів з цінними ознаками.

Соматичні клітини рослин *тотипотентні*, тобто від клітин, ізольованих з різних рослинних тканин, можна регенерувати цілу рослину. Регенерації повноцінних рослин з калюсу досягають двома способами: диференціацією пагонів та коренів при зміні співвідношення гормонів *ауксинів* та *цитокінінів*, а також утворенням так званих *ембріоїдів*.

Якщо до живильного середовища додати гормони в певних співвідношеннях, можна викликати ріст паростків та кореневої системи. Ауксини стимулюють ріст коренів, цитокініни – утворення конуса росту та паростків. Для утворення і коренів, і паростків, ауксини та цитокініни мають додаватися в певних співвідношеннях. Якщо співвідношення ауксини/цитокіни високе, утворюються корені, якщо низьке – паростки.

Цитокініни, або кініни, стимулюють поділ клітин. Вони утворюються в коренях і звідти мігрують.

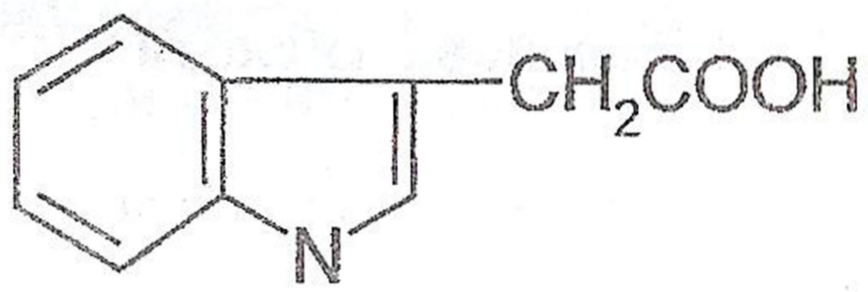


Цитокінін (зеатин)

Ще одна важлива властивість цитокінінів – їх здатність затримувати старіння що є особливо цінним для зелених листових овочів. Цитокініни

сприяють утриманню в клітинах ряду речовин, зокрема амінокислот, які можуть бути спрямовані на ресинтез білків, необхідних для росту рослин і оновлення їх тканин. Завдяки цьому сповільнюється старіння і пожовтіння, тобто листові овочі не так швидко втрачають свій товарний вигляд. Наразі робляться спроби використовувати один з синтетичних цитокінінів – бензиладенін, як інгібітор старіння багатьох зелених овочів, наприклад салату, брокколі і селери.

Речовини, які стимулюють розтягування клітин рослин, відомі під загальною назвою *ауксини*. Ауксини виробляються і накопичуються у високих концентраціях у верхівкових меристемах (ростових конусах пагонів і кореня), тобто в тих місцях, де клітини особливо швидко діляться. Під назвою *ауксин* об'єднано ряд речовин-регуляторів росту. Найважливіші з них названі гетероауксинами та являють собою β-індолілоцтову кислоту (ІОК):



β-індолілоцтова кислота

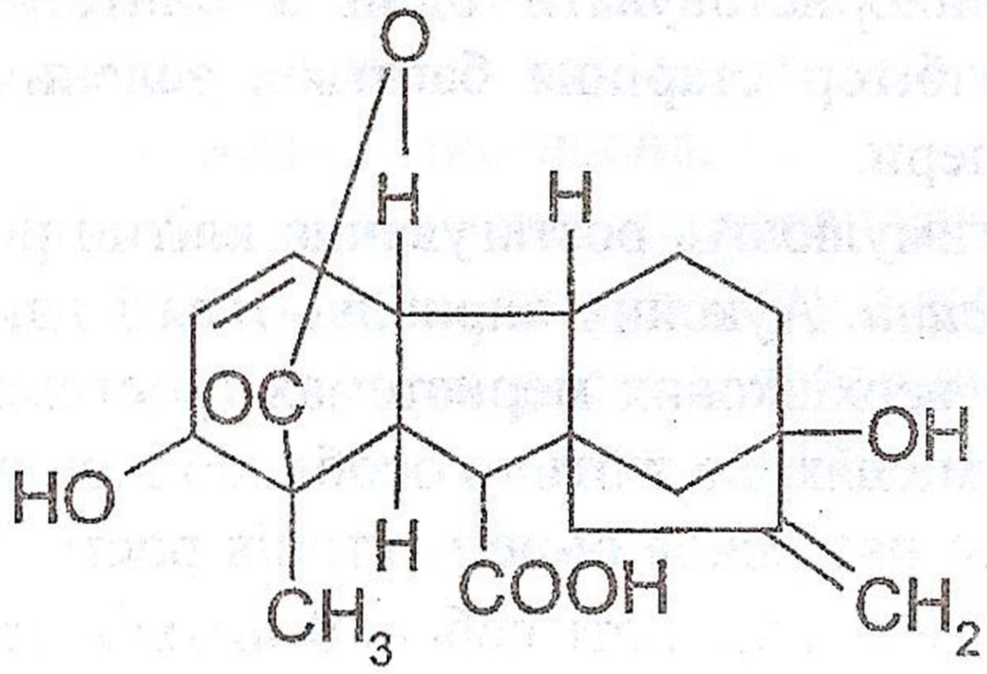
У великих кількостях ІОК утворюється мікроорганізмами, дріжджами та деякими грибами. Проте цей природний ауксин застосовується в сільському господарстві значно рідше, ніж такі синтетичні ауксини, як індолілмасляна кислота, β-нафтилоцтова кислота і 2,4-дихлорфенолоцтова кислота (2,4Д). Річ у тому, що ІОК під дією ферментів рослини безперервно руйнується, тоді як синтетичні сполуки не схильні до ферментативного руйнування, і тому їх малі дози здатні викликати помітний і тривалий ефект. У високих концентраціях 2,4Д може застосовуватися, як гербіцид селективної дії.

Близько до групи гетероауксинів стоять *гербіциди* – похідні феноксіоцтової кислоти. У культурі клітин, тканин та органів рослин найчастіше застосовують 2,4-дихлорфеноксіоцтову, 2,4,6-трихлорфеноксіоцтову та 2-метил-4-хлорфеноксіоцтову кислоти. Натрієві та амонійні солі цих кислот, а також їхні ефіри розчинні у воді. Крім того, застосовуються етаноламінові солі.

Дуже слабкі концентрації гербіциду сприятливо позначаються на проростанні насіння, а також на цвітінні рослин. Їх, в основному, застосовують для прискорення проростання ячменю при виготовленні солоду та для підвищення врожайності винограду.

Прискорений ріст рослин, і зокрема з клітин калюсу, відбувається під дією продуктів обміну речовин гриба *Gibberelia fujukuroi*. Ці речовини (терпеноїди), виділені у чистому вигляді, отримали назву *гіберелінів*.

Гібереліни широко розповсюджені у рослинах і регулюють цілий ряд функцій. Ідентифіковано понад 13 молекулярних форм гіберелінів, дуже схожих за хімічною будовою, але вони значно відрізняються за своєю біологічною активністю. Серед синтетичних гіберелінів найчастіше застосовується гіберелова кислота:

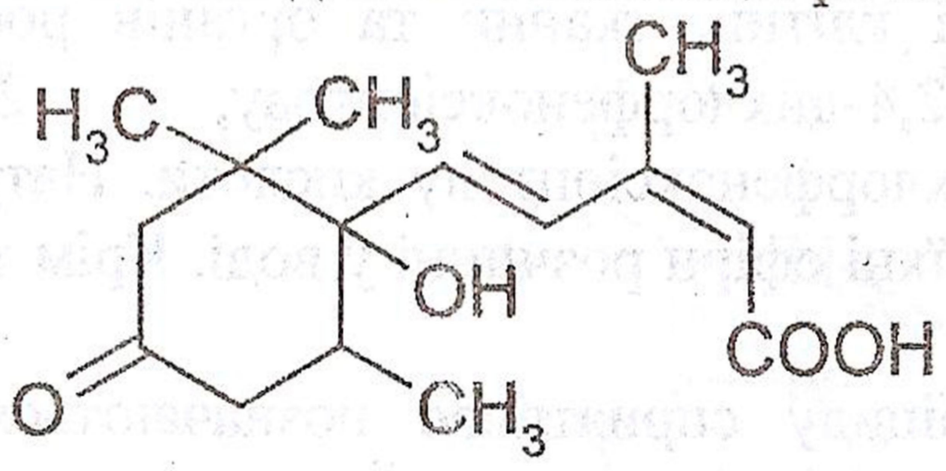


Гіберелова кислота

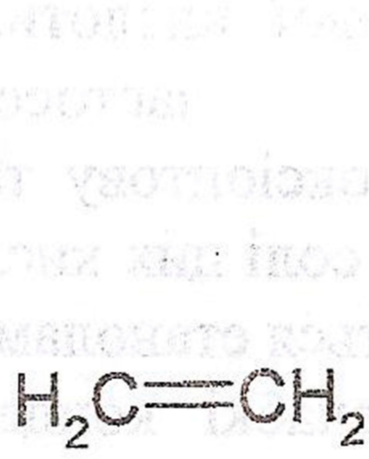
Важливий фізіологічний ефект гіберелінів – прискорення ростових процесів у рослин. Однак гібереліни здатні стимулювати не тільки ріст рослин, але їхнє цвітіння. Гібереліни також застосовують головним чином для прискорення проростання ячменю у виготовленні солоду та для підвищення врожайності винограду.

Пізніше відкрили ряд сполук, що сильно стимулюють поділ рослинних клітин. Йдеться про цитокініни, згадані вище. Найактивніший з них – кінетин. Дуже активною сполукою виявилася також дифенілсечовина, виділена з кокосового молока.

До рослинних гормонів відносять також абсцизову кислоту (АБК), яка застосовується з метою зменшення інтенсивності транспірації та підвищення стійкості рослин до посухи і вважається гормоном стресу, а також етилен, який у практиці використовується для прискорення дозрівання плодів багатьох видів рослин:



Абсцизова кислота



Етилен

В даний час синтезовано багато речовин, які також здатні регулювати процеси росту рослин, оскільки за своєю структурою вони подібні до нативних фітогормонів. До них, зокрема, відносяться індомасляна,

індопіровиноградна, жасминова, надетилоцтова кислоти, кислотні аналоги ауксинів та інші сполуки (потейтин, емністим С, триман-1).

Дія ростових речовин проявляється при їхніх дуже низьких концентраціях Так, 1 г ауксину вистачає для 10^{13} рослин. Ростові речовини рослин за активністю на одиницю маси не поступаються тваринним гормонам.

Інший шлях утворення рослин з клітин калюсу – утворення ембріоїдів – вперше простежили в 1959 р. у моркви; з часом його стали застосовувати при виробництві життєздатних рослин різних видів.

Ізольовані клітини зберігають здатність синтезувати речовини, притаманні батьківській рослині – вітаміни, гормони, алкалоїди, кумарини, стероїди тощо. Це важливо для використання таких речовин у промисловості.

Меристемні культури використовують для вегетативного розмноження рослин. До такого методу вдаються, коли виникають труднощі при статевому розмноженні сорту, коли отримано вдалий гібрид, але його властивості неможливо зберегти, розмножуючи статевим шляхом, а також для розмноження соматичних мутантів – так званих *спортів*. Для розмноження дерев беруть клітини молодого листя з верхівки дерева, не ушкоджуючи меристеми верхівкової бруньки (інакше дерево неодмінно загине).

Рослини, отримані в результаті клітинної селекції, стійкі проти збудників картопляної гнилі, фітофтори, до гербіцидів тощо.

Щоб збільшити кількість незамінних амінокислот у рослинах, отримують мутанти на клітинному рівні, стійкі проти токсичних аналогів амінокислот. Так, клітини моркви, стійкі проти аналогу метіоніну – етіоніну –синтезували у 20 разів більше метіоніну, ніж вихідні клітини; клітини, стійкі проти 5-метилтриптофану, продукують у 30 разів більше триптофану, а стійкі проти аміноетилцистеїну – у 50 разів більше лізину.

В умовах *in vitro* іноді долається несумісність досить віддалених видів і навіть родів рослин. Проте буває й так, що схрестити рослини, які належать до двох різних видів або родів, вдається, але отримане від гібридизації насіння не проростає – позначається вплив несумісності. Це явище, наприклад, спостерігається при схрещуванні пшениці та жита.

2.4. Гібридні клітини та трансплантація ядер

Ще у XIX ст. відзначили той факт, що деякі клітини, як патологічних (пухлини, патологічні ділянки, утворені при коровій віспі), так і нормальних тканин (м'язові волокна), можуть містити більш як одне ядро. Причиною цього буває, з одного боку, ділення ядер без одночасного поділу клітин, а з другого – злиття кількох клітин і утворення багатоядерної клітини (синцитію). Таке злиття відбувається не тільки серед

диференційованих клітин у багатоклітинних організмах, але й між клітинами в культурі. При цьому зливатися одна з однією можуть як клітини різного типу, що належать до того самого виду (наприклад фібробласти та лімфобласти миші), так і клітини тварин різних видів (приміром миша/людина, хом'як/курка, комар/людина тощо).

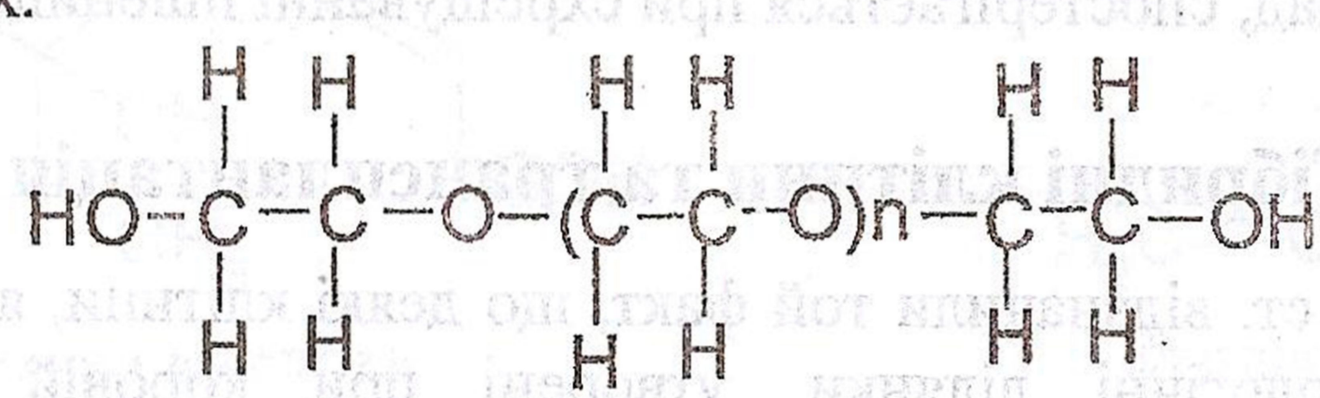
Гібридна клітина -- це клітина, яка утворилася при злитті двох або більшої кількості соматичних клітин. Процес штучного злиття двох або декількох клітин, тобто поєднання в єдиній цитоплазмі двох або декількох ядерних матеріалів від різних клітин, отримав назву *гібридомної технології*, а отримані клітини були названі гібридними, або *гібридомами*. Якщо для злиття клітин узято дві клітини від однієї і тієї ж рослини або тварини, то гібридні клітини називають *гомокаріонами*. Вони містять ядра тільки одного батьківського типу клітин. Якщо ж клітини отримані від різних видів рослин або тварин, то вони називаються *гетерокаріонами*. Гетерокаріони містять ядра обох батьківських видів.

При злитті відбувається поєднання клітинних мембран, цитоплазми і, що головне, хромосомних наборів клітин. При цьому утворені клітини успадковують і поєднують в собі властивості обох батьківських клітин, у тому числі і здатність до розподілу і специфічності різних біосинтезів.

Гетерокаріони, що утворилися, можуть або загинути, проіснувавши в культурі певний час, або вижити і дати початок двом одноядерним гібридним клітинам, які називаються *синкаріонами*. Наразі замість терміну «синкаріон» використовують термін «гібридна клітина».

У довгоживучих проліферуючих синкаріонах часто відбувається редукція числа хромосом. При цьому, якщо у внутрішньовидових гібридах звичайно зберігаються всі або велика частина батьківських хромосом, то в міжвидових синкаріонах, як правило, має місце втрата хромосом при розподілі. Наприклад, в синкаріоні миша-людина з часом елімінуються хромосоми людини, а не миші.

Поліетиленгліколь (ПЕГ) – нетоксичний водорозчинний синтетичний полімер, що володіє здатністю вибірково осаджувати специфічні білки, не денатуруючи їх.



Поліетиленгліколь

ПЕГ викликає аглютинацію рослинних протопластів, а при подальшому поступовому розведенні ростовим середовищем – інтенсивне злиття

цих клітин. З особливим успіхом для злиття клітин використовується ПЕГ з молекулярною масою від 1500 до 7500. Можливо, завдяки тому, що у водному розчині ПЕГ несе невеликий негативний заряд, молекули цього розміру є достатньо великими для того, щоб між клітинами виникали електростатичні зв'язки. Двохвалентні іони, присутні у середовищі, утворюють містки між ПЕГ та негативно зарядженими вуглеводами, що знаходяться на поверхні клітини, посилюючи у такий спосіб аглютинацію клітин.

До інших аглютинуючих агентів, здатність яких викликати злиття клітин була досліджена спеціально, відносяться лектини рослин (фітогемаглютинін, конканавалін А) і антитіла.

Метод отримання і культивування гібридних клітин став одним із найважливіших інструментів, який використовують у клітинній біології, генетиці, біології пухлин, біології репродукції, онкології і вірусології. Зараз гібридна технологія з успіхом застосовується в імунобіології та діагностичній медицині. Цей метод використовують також для вирішення практичних питань охорони здоров'я, оскільки за продуктами експресії генома батьківської клітини, що залишається у геномі гібриду, визначають ознаки спадкових захворювань. За допомогою методу гібридизації соматичних клітин вдається реактивувати онкогенний вірус. При злитті клітин-вірусоносіїв з нормальними клітинами, чутливими до пухлинотворного вірусу, в утворених гібридах відбувається реактивація цього вірусу, який розмножується в кількостях, доступних для його виявлення. Цей методичний прийом використовують для визначення онкогенного вірусу у пухлинних клітинах. Так, питання щодо злоякісності або доброякісності гібриду, отриманого з пухлинної та нормальної клітини, вирішують залежно від наявності або відсутності у гібридній клітині певних хромосом.

Ще одним, найпоширенішим напрямком робіт з гібридизації соматичних клітин стало створення гібридом, отримуваних злиттям пухлинних клітин та клітин імунної системи, здатних секретувати імуноглобулін. Такі гібридоми характеризуються поєднанням здатності до тривалого розмноження в культурі зі здатністю до біосинтезу моноклональних антитіл.

Відомо, що гени, характерні для одних клітин (наприклад, для нервової системи), можуть експресуватися в гібридомах, причому це відбивається на фенотипі клітин. Таким чином, метод гібридизації клітин можна використовувати для виправлення фенотипу клітин, які мають генетичні дефекти. Так, використовуючи гібридомні технології, вважається можливим лікувати деякі генетичні дефекти людини (хвороб Тей-Сакса та Сандхоффа).

В опрацюванні методів пересадки ядер ссавців суттєву роль відіграло використання *цитохалазину В.* Ця синтезована грибами речовина сприяє унікальному розміщенню положення ядра, коли воно залишається з'єднаним

з клітиною тонкою ниткою цитоплазми. При центрифугуванні ця "пуповина" розривається з утворенням *енуклейованих* (без'ядрових) клітин – *цитопластів.* Інший компонент, який при цьому утворюється, це – ядра, що відокремилися (*каріопласти*). Такі утворення, що їх називають також *міні-клітинами*, оточені тонким шаром цитоплазми та плазматичної мембрани.

Цитопласти здатні синтезувати білки, а також підтримувати репродукцію деяких вірусів. Вони містять усі види органел, притаманні нормальній клітині, зберігають здатність прикріплюватися до субстрату й утворювати складчасту мембрану, характерну для цілих клітин; здатні пересуватися та здійснювати піноцитоз.

Щодо каріопластів, то вони утримують навколо себе шар цитоплазми (близько 10 % від усього об'єму). Він містить компоненти ендоплазматичного ретикулуму, деяку кількість мітохондрій та рибосом. Центріолі у каріопластів, на відміну від цитопластів, відсутні.

Для трансплантації ядер і реконструювання клітин раніше отримані цитопласти у вигляді моношару піддають контактові з вірусом Сендай, попередньо інактивованим УФ опроміненням. При створенні гібридів до моношару цитопластів додають суспендовані у буферному розчині каріопласти. Цю операцію здійснюють таким чином, щоб на один цитопласт припадало близько 100 каріопластів. Для доброї адсорбції каріопластів на вкритих вірусними частинками цитопластах проводять інкубацію компонентів протягом певного часу при температурі 4 °С. Після цього, для проведення кінцевого етапу – злиття цитопластів і каріопластів – суміш інкубують при температурі 37 °С. Отримані гібридні конструкції далі очищають від каріопластів, що не злилися, відмиваючи їх живильним середовищем. Цитопласти, що не злилися з ядрами, знищують, додаючи середовище, придатне для культивування лише клітин-донорів каріопластів. На такому середовищі цитопласти без ядер гинуть, після чого їх легко відокремити від гібридних клітин за допомогою центрифугування.

Ефективність реконструювання клітин за рахунок злиття каріопластів та цитопластів залежить від ряду поки що не досить визначених фізіологічних факторів. Вважають, що лише приблизно 9 % реконструйованих клітин можуть далі рости і ділитися. У гібридних клітинах одразу ж після злиття починаються морфологічні зміни. Через кілька днів реконструйовані гібридні клітини майже зовсім не відрізняються від вихідних батьківських, використаних як донори ядер.

Як вже вказувалося, у рослинництві гібридизація соматичних клітин злиттям ізольованих протопластів – ще один біотехнологічний спосіб перетворення рослин поза бар'єрами статевого схрещування.

У природі статева несумісність між рослинами часто заважає потенційно корисним схрещуванням. Культура протопластів дає змогу отриму-

вати гібриди нестатевим шляхом, злиттям соматичних клітин. У результаті регенерації рослин з гібридних протопластів можна отримувати зовсім нові типи їх. Прикладом можуть бути культивовані соматичні гібриди картоплі з томатом, які несуть певні ознаками обох батьківських форм.

Протопласти несуть електричний заряд, а тому вони не здатні зливатися спонтанно. Для злиття їх необхідний вплив так званих факторів злиття (*фузигенних факторів)* (певна величина pH середовища, концентрація катіонів, хімічні речовини, які викликають агрегацію протопластів – поліетиленгліколь, полівініловий спирт та фізичні фактори – змінне електричне поле). Під їхнім впливом здійснюють злиття протопластів найвіддаленіших форм: сої з ячменем, кукурудзи з рапсом, сої з морквою, а також рослинних протопластів з тваринними чи бактеріальними.

Методом злиття протопластів можна переносити гени стійкості проти хвороб або якісь інші гени в один прийом, що при звичайній гібридизації можливе або тільки через десятиріччя, або взагалі неможливе внаслідок філогенетичної віддаленості, коли клітини зовсім не схрещуються. Скажімо, селекційну картоплю гібридизували злиттям протопластів з дикою картоплею, стійкою проти деяких вірусних захворювань.

2.5. Методи перенесення генів за допомогою метафазних хромосом

Мітоз, або непрямий поділ – основний спосіб розмноження еукаріотичних клітин, що обумовлює можливість збільшення їхньої біомаси, ріст і регенерацію. Мітоз складається з чотирьох фаз – ***профази***, ***метафази***, ***анафази*** та ***телофази***. З огляду на тему даного розділу, слід відзначити, що хромосоми найбільше компактизуються з відповідним вкороченням їхньої довжини та вишикуванням їх по екватору клітини саме на етапі метафази (Рис. 13).

Можливість перенесення чужорідної генетичної інформації у соматичні клітини тварин за допомогою метафазних хромосом вперше доведена у 1973 р. американськими вченими Дж. Мак-Брайдом та А. Озером. Метод ізольованих хромосом нині широко використовують у біології та її різноманітних прикладних відгалуженнях – від вивчення механізмів генної регуляції до проблем медицини й сільського господарства.

Перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини – процес багатоетапний. Для отримання великої кількості мітотичних клітин їх затримують на стадії мітозу (цей етап має назву „синхронізація клітин"). Після цього виділяють метафазні хромосоми, суспензією яких обробляють реципієнтні клітини. Наступна стадія – виділення, розмноження та аналіз клітин-трансформантів. Такий аналіз проводять з метою ідентифікації озна-

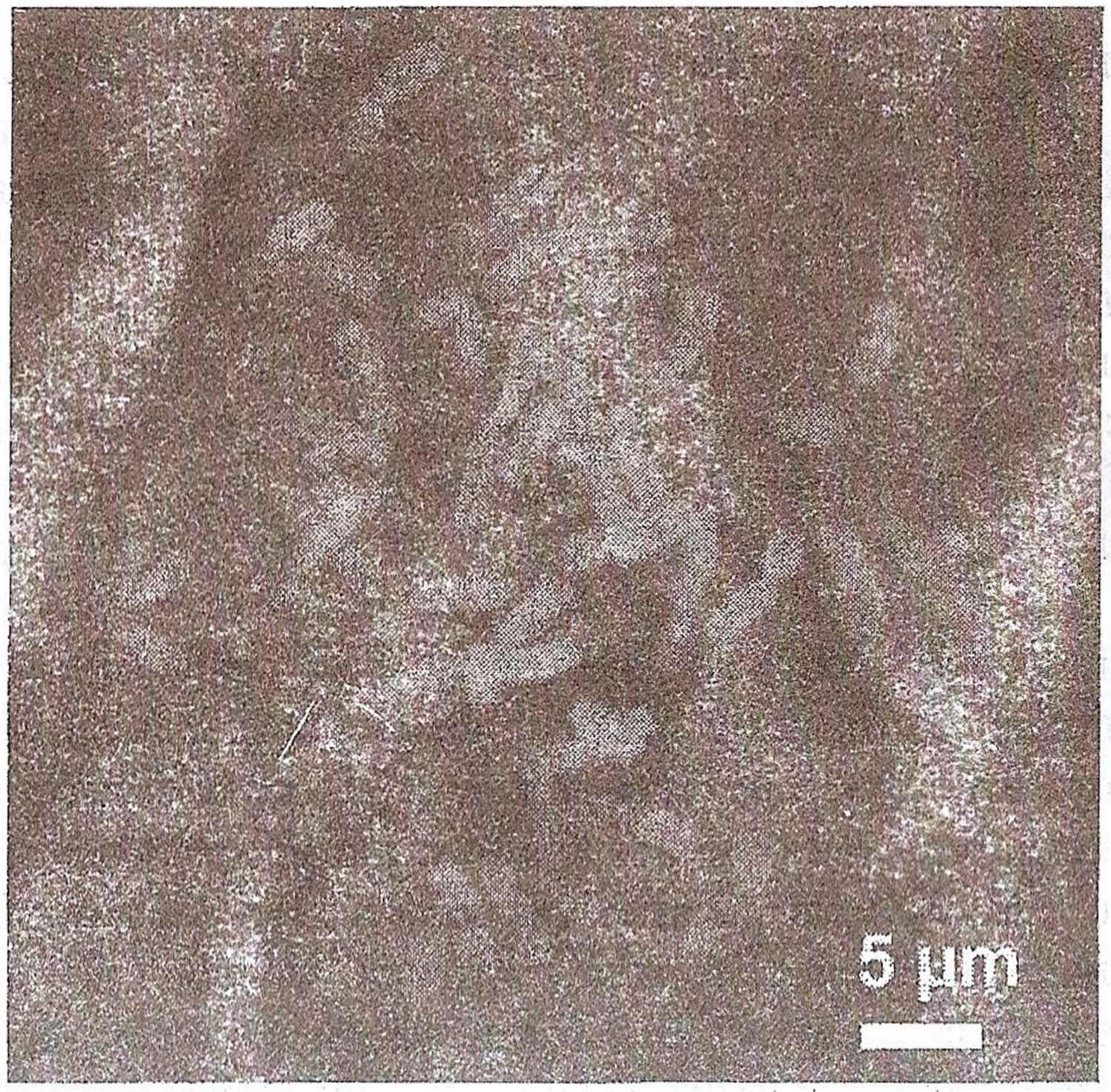


Рис. 13. Метафазні хромосоми людини

ки донорського генома у трансформантах. Джерелом метафазних хромосом (донорські клітини) найчастіше виступають фібробласти первинних культур або фібробластоподібні клітини перещеплюваних ліній клітин жаби, китайського хом'ячка, миші, щура або людини. Слід відзначити, що генотип цих клітин належить до дикого типу. На відміну від них, еукаріотичні клітини, куди переноситься генетичний матеріал (реципієнтні клітини), належать до мутантних ліній. У таких клітинах не спрацьовує ряд певних ферментів (як-от тимідинкінази). Про те, чи відбулося перенесення частини генома з донорської клітини у реципієнтну, судять за визначенням згаданих ферментативних активностей, раніш відсутніх, та у зв'язку з цим – за здатністю рости на відповідних селективних середовищах. Це, з одного боку, підтверджує факт переносу, а з другого стає підходом до вивчення морфології та біохімії хромосом.

Для досягнення успіху в перенесенні генів за допомогою метафазних хромосом, передовсім необхідно отримати у моношаровій культурі велику кількість мітотичних клітин. З цією метою використовують прийом синхронізації клітин за допомогою введення в середовище *колхіцину* або *колцеміду*. Завдяки ним клітини затримуються на стадії мітозу, і у клітинній популяції їх кількість клітин, затриманих на стадії метафази, сягає 94–97 %. До того ж такі клітини моношарової культури бувають слабо прикріплені до субстрату, що полегшує відокремлення їх від інших клітин.

Для виконання наступної операції – руйнування клітинної мембрани – метафазні клітини вміщують у гіпотонічний розчин. Висока ефективність руйнування клітинних мембран досягається використанням гомогенізаторів або багаторазовим пропусканням клітинної суспензії через шприц з тонкою голкою.

Для масового виділення однотипних хромосом поєднують фракціонування у градієнті щільності та подальшого сортування отриманої фракції методом проточної цитометрії. Останню здійснюють за допомогою спеціальних приладів – проточних цитофлуориметрів (Рис. 14).

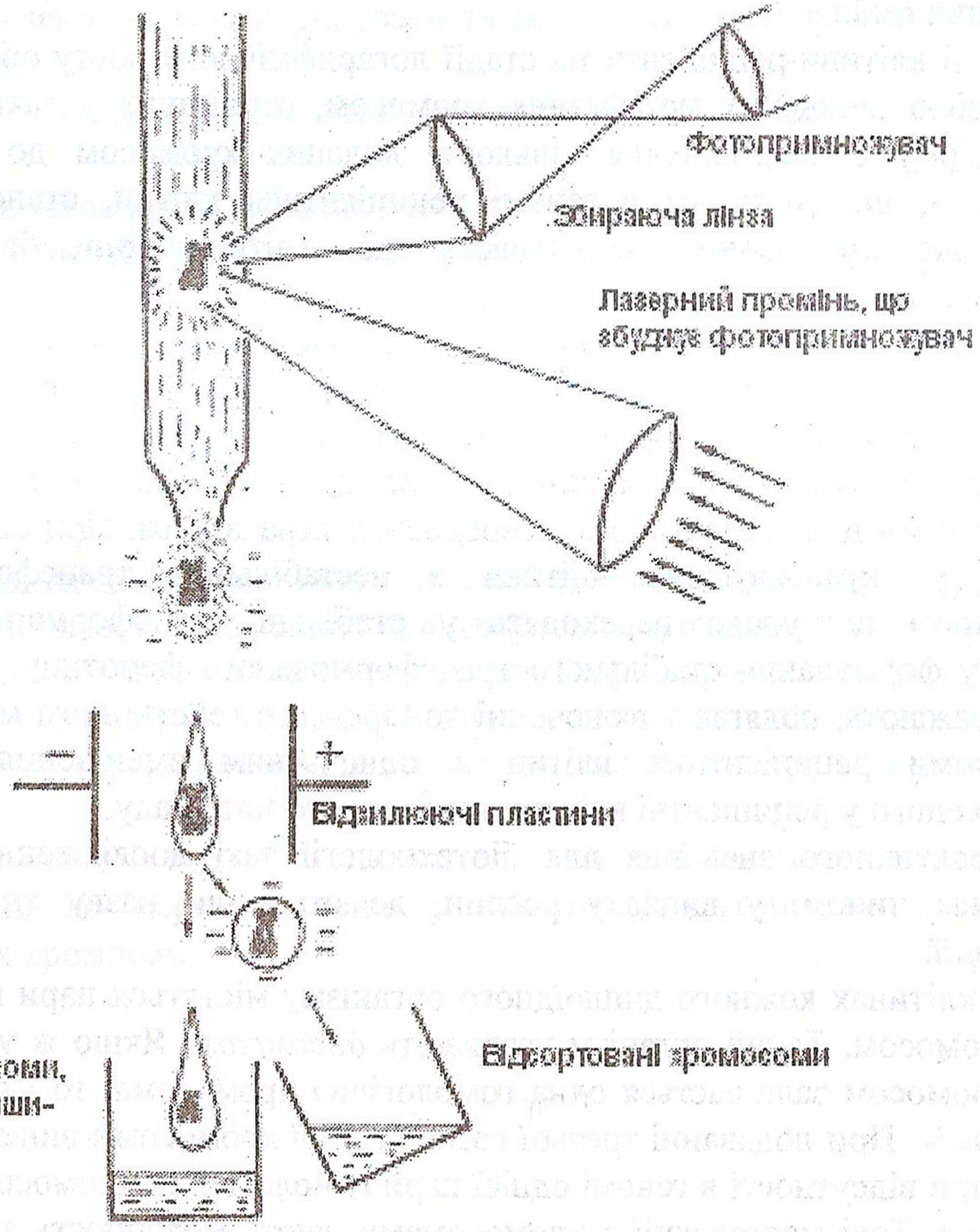


Рис. 14. Принцип сортування хромосом у проточних цитофлуориметрах за допомогою лазера. Хромосоми пофарбовані флуоресціюючим барвником. Флуоресценція збуджується лазерним променем і вимірюється для кожної хромосоми окремо. Дані вимірювань використовують для сортування хромосом.

Цей метод може бути використаний у двох різних цілях:

1) для ідентифікації і кількісного аналізу великої кількості хромосом на протязі дуже короткого часу;

2) для препаративного розділення хромосом.

Метод має дві переваги перед стандартними методами аналізу хромосом: по-перше, він є повністю автоматичним, завдяки чому виключається елемент суб'єктивності: по-друге, він є надзвичайно швидким.

Важливо, що цей метод дає змогу препаративно розділяти хромосоми, а за наявності специфічних зондів можна виявляти присутність окремих потрібних генів.

Далі клітини-реципієнти на стадії логарифмічного росту оброблюють суспензією очищених метафазних хромосом, отриманих у такий спосіб. При цьому співвідношення кількості доданих хромосом до кількості хромосом, що містяться в геномі реципієнтних клітин, становить 1:1. Донорські хромосоми потрапляють до клітин-реципієнтів завдяки фагоцитозу.

Розрізняють два види трансформованого фенотипу. У разі стабільного фенотипу перенесена ознака при рості трансформантів на неселективному середовищі зберігається протягом декількох тижнів або навіть місяців. На відміну від цього, нестабільний фенотип при вирощуванні трансформованих клітин на неселективному середовищі втрачається. При більш-менш тривалому культивуванні клітини з нестабільним трансформованим фенотипом поступово переходять у стабільні трансформанти. Щодо процесу формування стабільного трансформованого фенотипу, то він, як нині вважають, полягає у включенні донорського генетичного матеріалу у хромосоми реципієнтних клітин з одночасним зменшенням обсягу перенесеного у реципієнтні клітини генетичного матеріалу.

Практичного значення для біотехнології такі дослідження набули, головним чином, у випадку рослин, де отримали назву *хромосомної інженерії*.

У клітинах кожного диплоїдного організму містяться пари гомологічних хромосом. Такий організм називають *дисоміком*. Якщо ж у будь-якій парі хромосом залишається одна гомологічна хромосома, то утворюється *моносомік*. При додаванні третьої гомологічної хромосоми виникає трисомік, а при відсутності в геномі однієї пари гомологічних хромосом виникає *нулісомік*. Такі маніпуляції з хромосомами дають можливість заміновати одну або обидві гомологічні хромосоми, наприклад, одного сорту пшениці, на таку ж пару хромосом, але з іншого сорту. У такий спосіб селекціонер може замінити одну ознаку, слабо виражену в даного сорту, на тотожну, але більш сильно виражену з іншого сорту. Так наближаються до створення «ідеального» сорту, у якого всі корисні ознаки будуть виражатися макси-

мально. Таку ж мету переслідує й методика заміни окремих хромосом на хромосоми іншого виду, близького за своїм походженням. Інший прийом полягає у введенні в геном певного виду або сорту якоїсь додаткової пари хромосом іншого виду рослин, що визначають розвиток ознаки, відсутньої в першого виду. Якщо таке введення пари додаткових хромосом вдається здійснити, то отримані форми називають *доповненими лініями.*

Контрольні запитання до 2 розділу

Які завдання можна вирішувати за допомогою методу культивування клітин iv vitro?

Як отримують клітинні лінії, які необхідні умови для культивування клітин?

Що таке стовбурові клітини, джерела їх отримання?

Які типи стовбурових клітин розрізняють та їх характеристики?

Опишіть напрямки застосування стовбурових клітин у медицині та які можливі ризики?

Що таке мікророзмноження рослин, його переваги?

Яка роль фітогормонів у клональному мікророзмноженні рослин?

Як отримують калюсну тканину і які можливості її використання в біотехнології?

Отримання та використання клітинної суспензійної культури.

Які особливості отримання і культивування протопластів?

Соматична гібридизація, роль фузігенних факторів.

Яким чином можна отримати безвірусний посадковий матеріал?

Опишіть можливості використання гаплоїдних рослин у селекційному процесі.

Трансплантація ядер. Що таке цитопласти, каріопласти, міні-клітини?

Підходи до переносу генів у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом.