- **Протопласты растительных клеток как объекты биологического конструирования**
- *Способы выделения растительных протопластов*
- Протопласты растений – это клетки, лишенные целлюлозной оболочки, т.е. ограниченные мембраной цитоплазматические образования, несущие внутриклеточные органоиды и характеризующиеся структурной целостностью и способностью осуществлять активный метаболизм и выполнять биосинтезы и трансформацию энергии.
- Термин был использован Д. Ханстеином (Ганштейном) в 1880 г. для обозначения морфологически обособленных образований при плазмолизе.

- Впервые выделение растительных протопластов было осуществлено в 1892 г. **Дж. Клеркером** при изучении плазмолиза в клетках водного телореза (*Stratiotes aloides*) при механическом повреждении ткани.
- Данный способ выделения протопластов получил название «**механический**».

- ***1. Механический метод*** получения растительных протопластов.
- ***2. Ээнзиматический метод*** получения протопластов.

Рис. Схема общей процедуры получения растительных протопластов

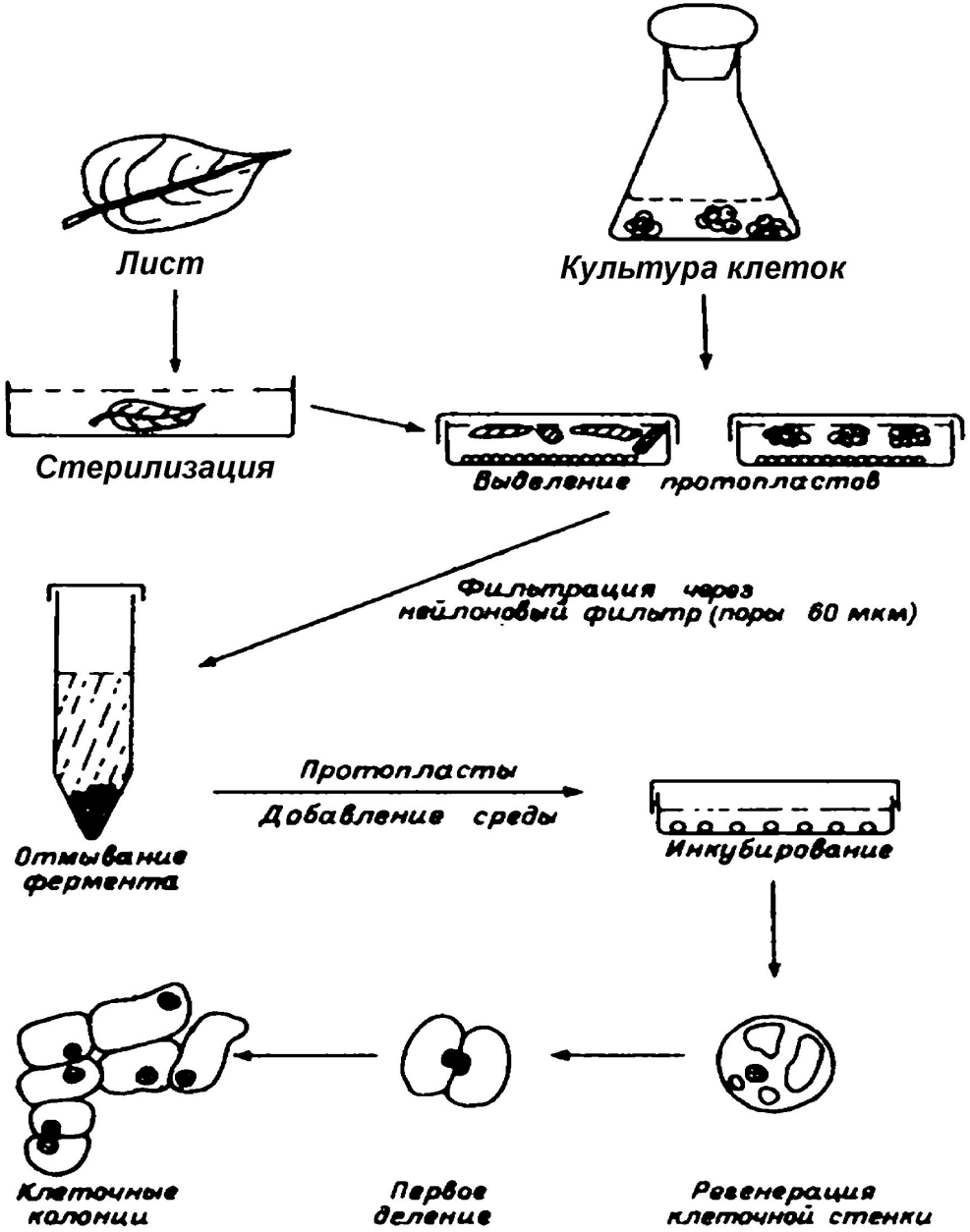


Рис. Схема общей процедуры получения растительных протопластов

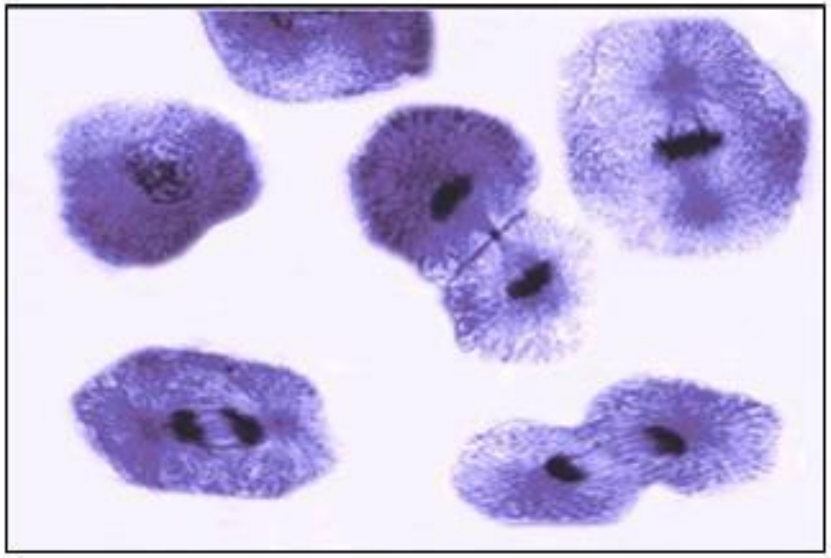


Рис. 3.4. **Каллусные клетки в разные фазы роста**

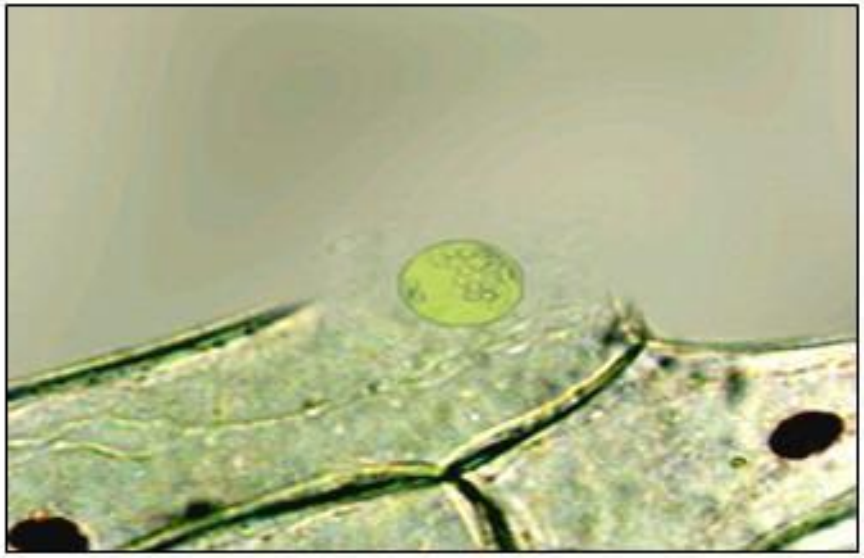


Рис. 3.5. **Выход протопласта через поврежденную стенку клетки**

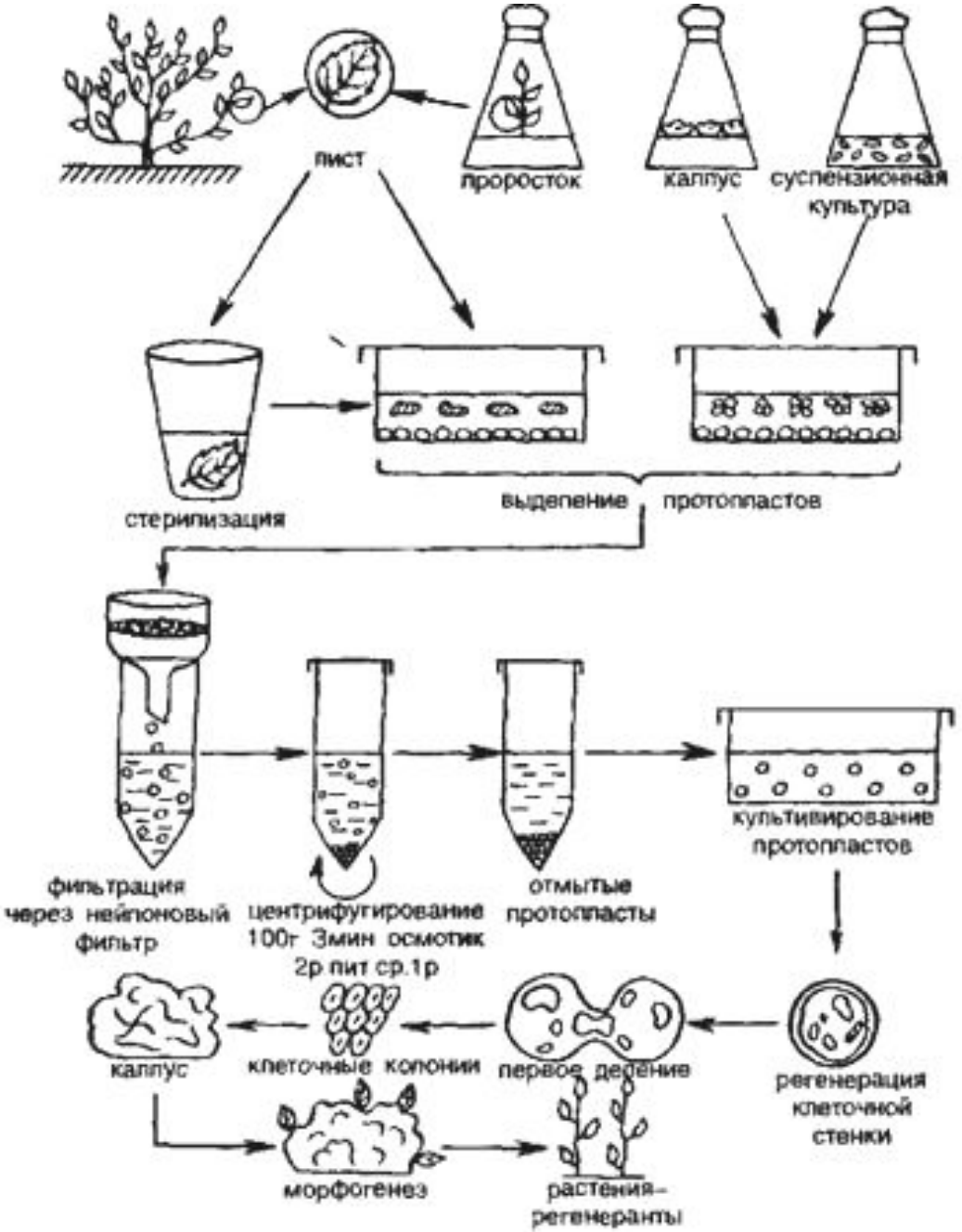
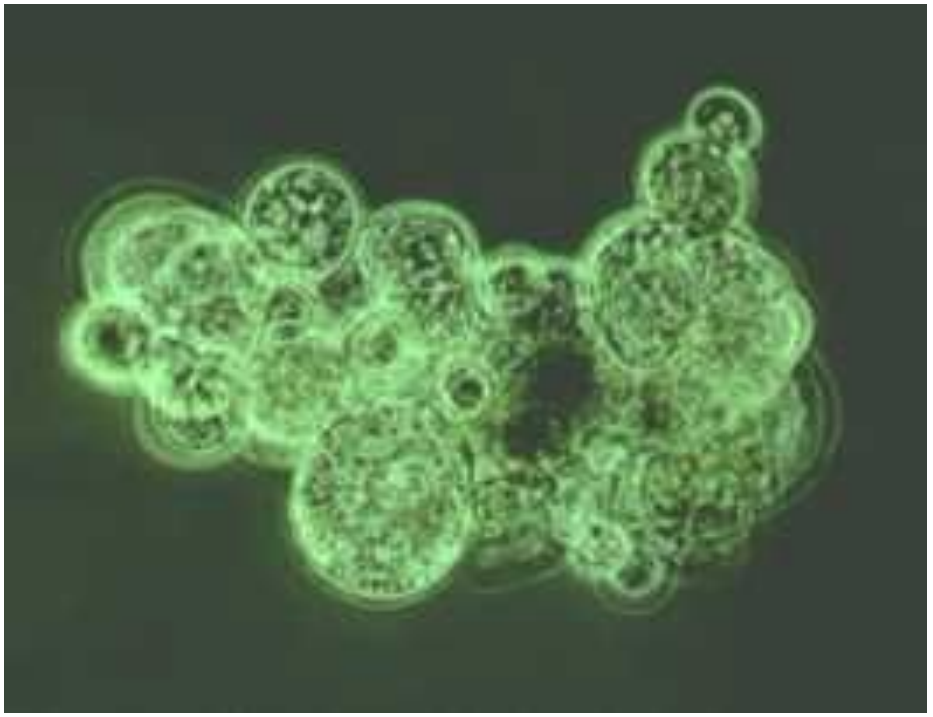


Рис. 1.16. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений

- Протопласты клеток табака



- **Культивирование растительных протопластов**

- Для культивирования протопластов возможно использовать ***метод жидких капель*** (Као К. и др., 1971).

- Удобным вариантом метода жидких капель является ***культивирование в малом объеме,*** предложенное **Ю. Глебой в 1978 г**.

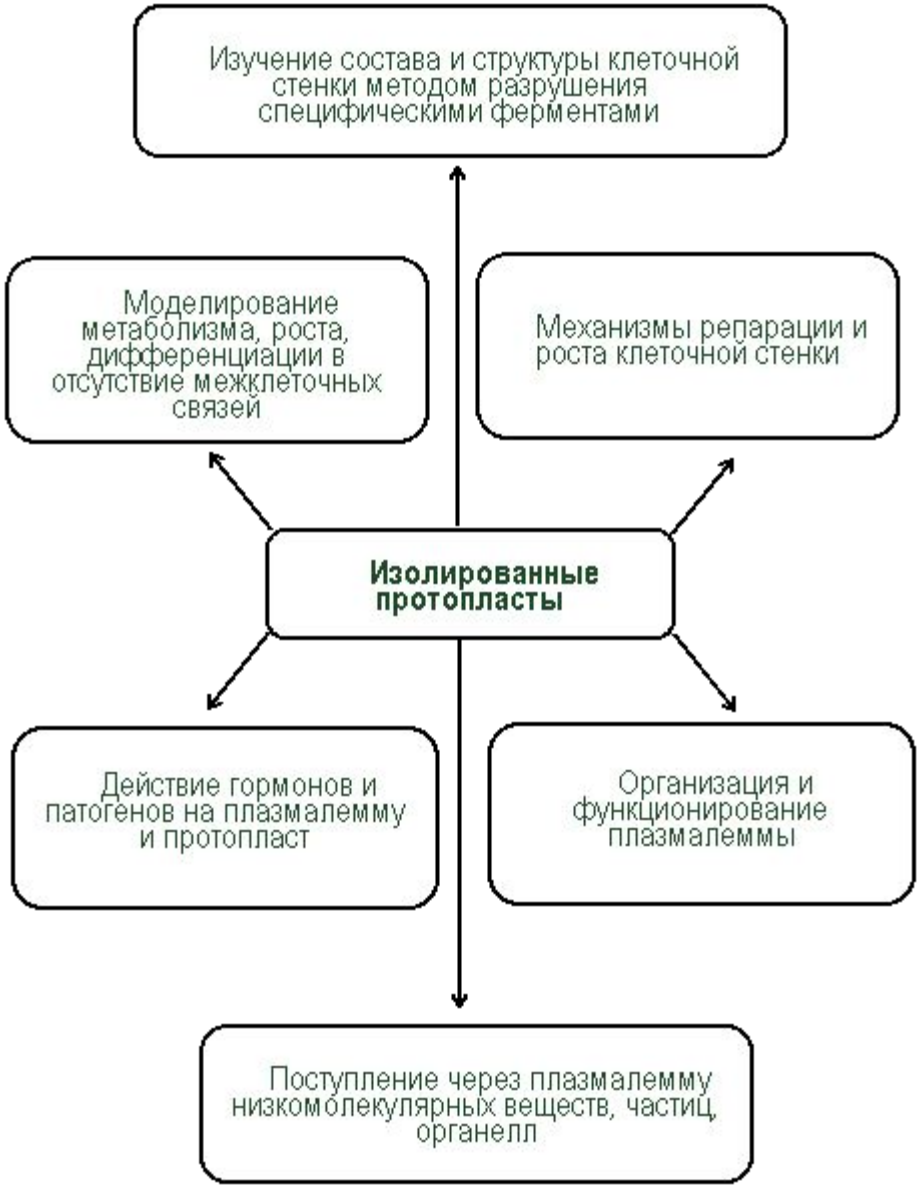
- Другой широко распространенный метод – ***агаровая культура*** или ***метод платирования*** (Нагата Т., Такебе И., 1971).

- Одним из вариантов данной методики является использование ***«кормящих клеток».***

- Сходным с этим методом является ***метод совместных культур*** (D. Evans, 1979).

- **Применение изолированных протопластов**

- Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных и прикладных физиологических проблем у растений.
- Изолированные протопласты имеют ряд областей применения:
- 1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).
- 2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.
- 3. «Мягкое» выделение органелл.
- 4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.
- 5. Введение чужеродных органелл (клеточная инженерия).
- 6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).


Изучение состава и структуры клеточной стенки методом разрушения специфическими ферментами
Моделирование метаболизма, роста, дифференциации в отсутствие межклеточных связей
Механизмы репарации и роста клеточной стенки
Изолированные протопласты
Действие гормонов и патогенов на плазмалемму и протопласт
Организация и функционирование плазмалеммы
Поступление через плазмалемму низкомолекулярных веществ, частиц, органелл

- **Основные методы клеточной инженерии и ускорения селекционного процесса**

- Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей in vitro, используемые в клеточных технологиях с целью облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса при создании новых форм и сортов растений, условно можно разделить на две группы.
- Первая группа – это ***вспомогательные технологии***, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: **оплодотворение *in vitro*** (преодоление прогамной несовместимости), **культивирование незрелых гибридных зародышей** (преодоление постгамной несовместимости), **получение гаплоидов** путем культивирования пыльников и микроспор, **клональное микроразмножение**.
-

- Вторая группа объединяет ***основные технологии***, приводящие к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: **соматическая гибридизация** (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов), **клеточная селекция** с использованием каллусной ткани, **криосохранение** ценного растительного материала и применение методов **генной инженерии**.

- ***основные технологии***

- **Слияние протопластов (парасексуальная, или соматическая гибридизация)**

- Изолированные протопласты, за то короткое время, пока они не образовали клеточной стенки, могут сливаться. Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так ***называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация.*** В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений.

- ***Химические способы индукции слияния протопластов***

- Феномен индукции слияния между протопластами различных таксонов для создания гетерокариона был впервые продемонстрирован **Е. Коккингом, Пауэром и сотрудниками в 1970 г**.

- Эффективна индукция слияния, предложенная **В.Келлером** и **Г.Мелчерсом в 1973 г.**

- ***Методы маркирования*** протопластов

- ***Физический способ*** слияния протопластов, разработанный **Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году**,

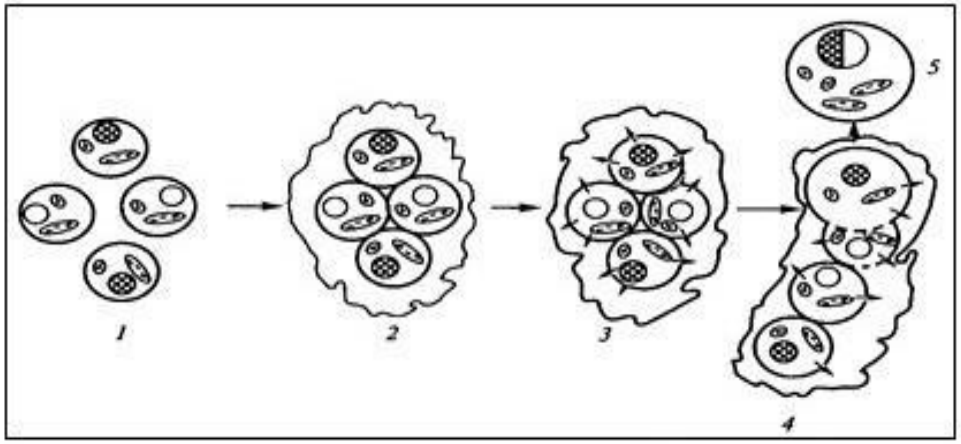


Рис. 4.1. **Слияние протопластов под действием полиэтиленгликоля**

1 – изолированные протопласты; 2 - слияние протопластов в результате дегидратации; 3 - образование пор в мембране протопласта; 4 – перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 – гибридный протопласт

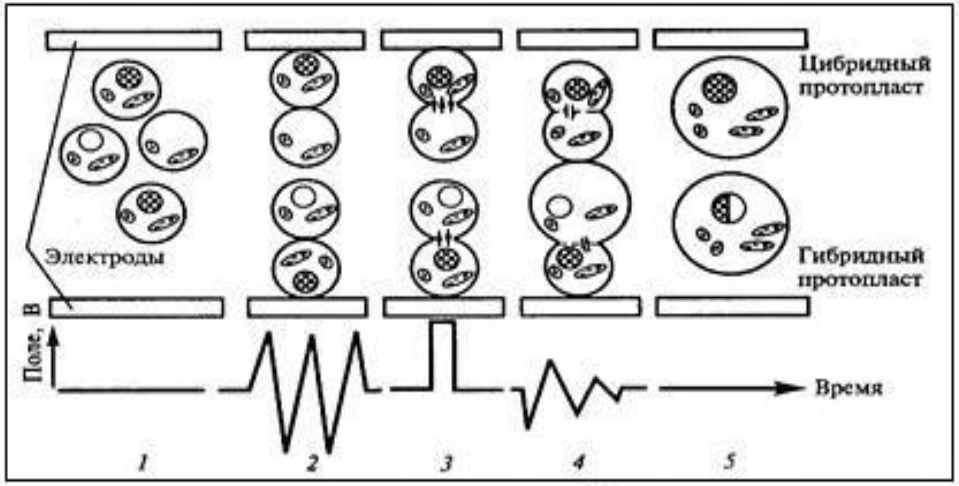
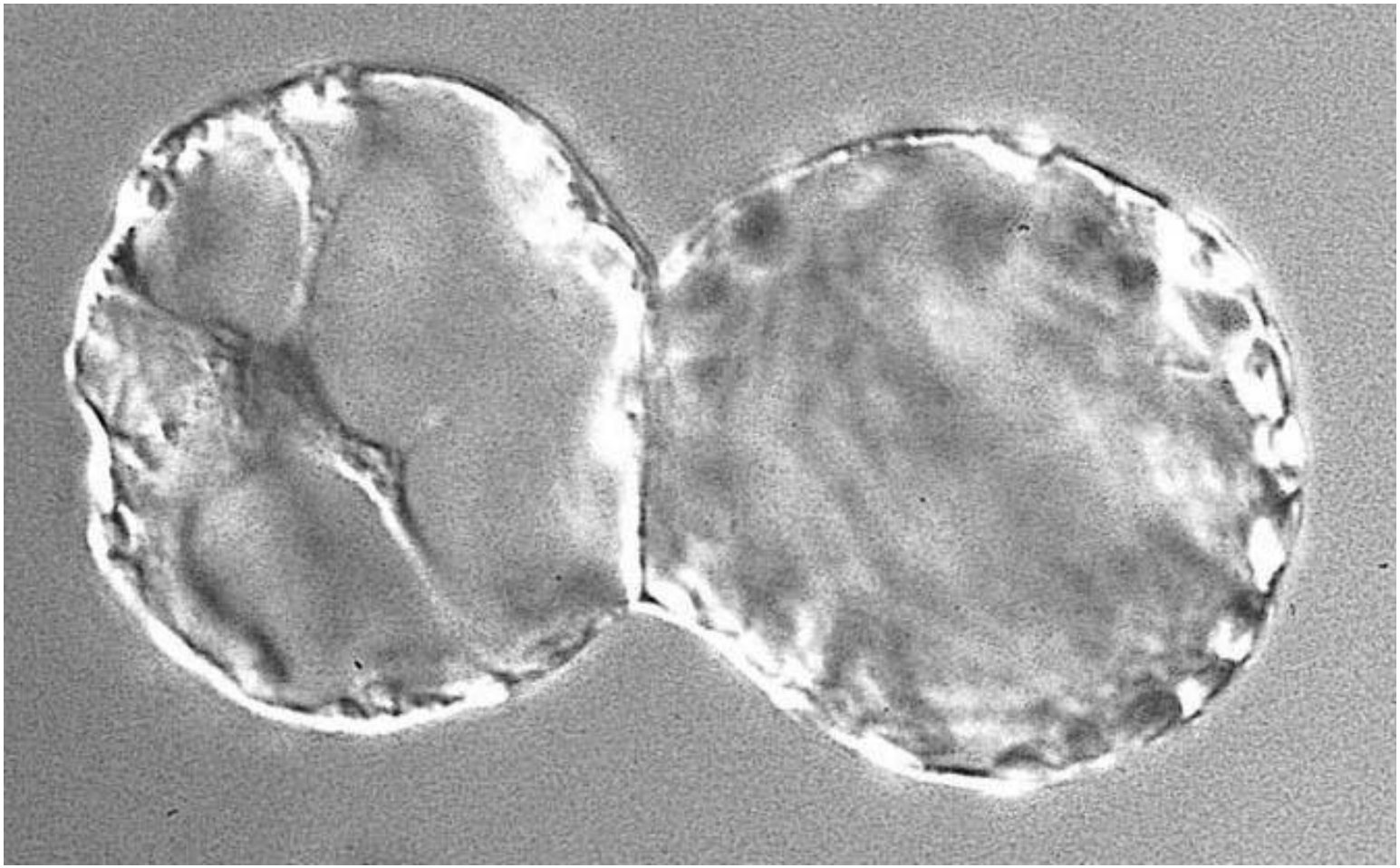


Рис. 4.2. **Слияние протопластов под действием электрического тока**

1 – изолированные протопласты; 2 – слияние протопластов полярными поверхностями; 3 - образование пор в мембранах под воздействием сильного импульса постоянного тока; 4 – смешивание цитоплазмы; 5 – образование гибридных протопластов

слияние протопластов



соматический гибрид

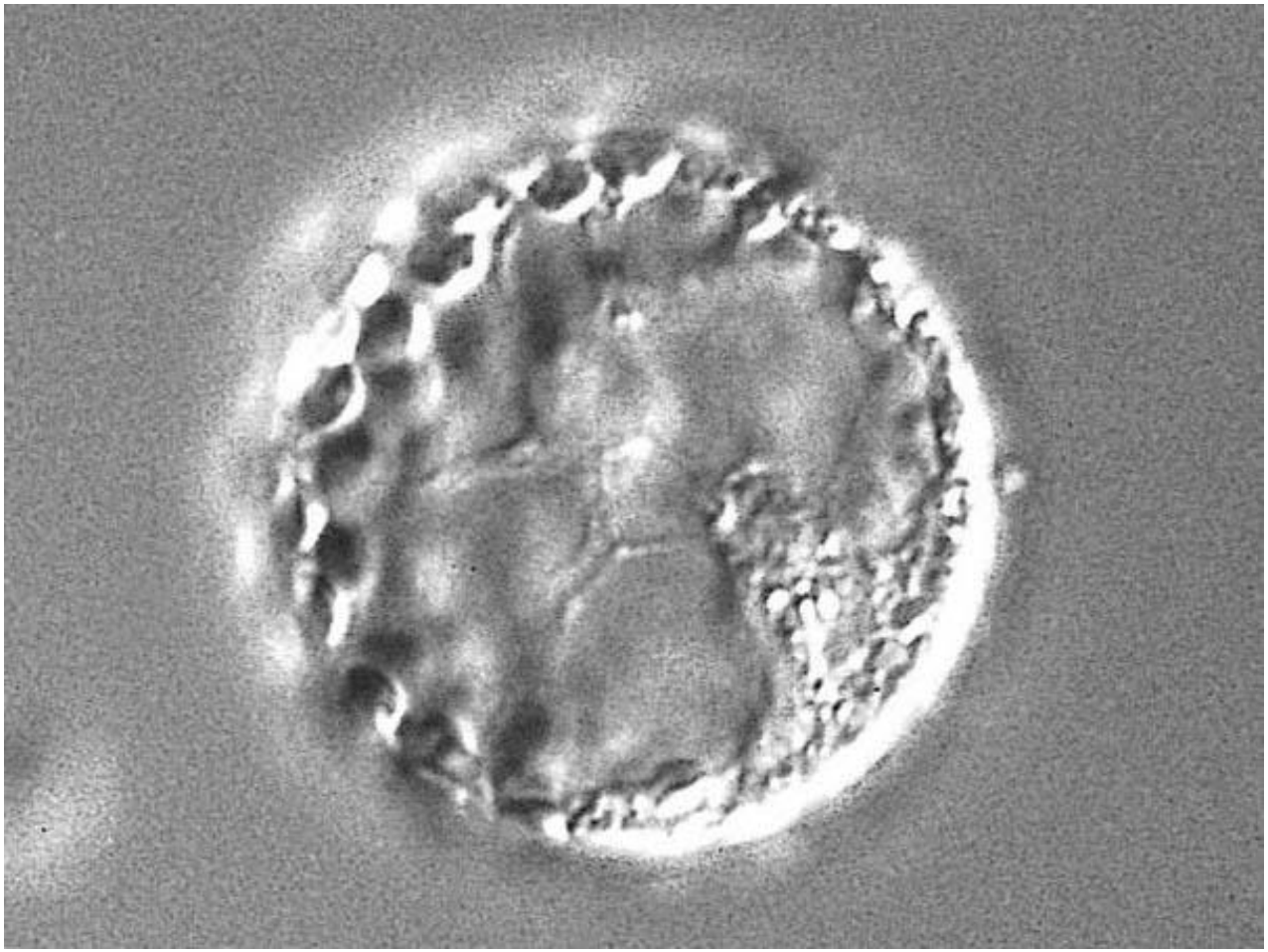


Рис. 98. *Упрощенная схема получения соматического гибрида картофеля*

- Для отдаленных гибридов характерно:
- 1. Относительная стабильность гибридного состояния, при котором не наблюдается полной элиминации генетического материала одного из родителей.
- 2. Генетические перестройки (реконструкция и частичная элиминация хромосом).
- 3. Генетическая разнокачественность клонов гибридных клеток.
- 4. Ограниченная морфогенетическая способность.

- **Судьба геномов (ядерного и цитоплазматического) после слияния протопластов может быть различной:**
- 1. Ядерные генетические детерминанты наследуются как дву-, так и однородительски. В последнем случае ядра не сливаются и впоследствии сегрегируют в процессе клеточных делений.
- 2. Внеядерные генетические детерминанты наследуются двуродительски. При этом в межвидовых комбинациях прослеживается тенденция к соматическому выщеплению и элиминации одного из родительских цитоплазматических геномов.
- 3. Возникновение гибридных клеток и растений в результате слияния более чем двух родительских клеток.

- Протопласты широко используются также в качестве реципиентов для клеточных органелл.

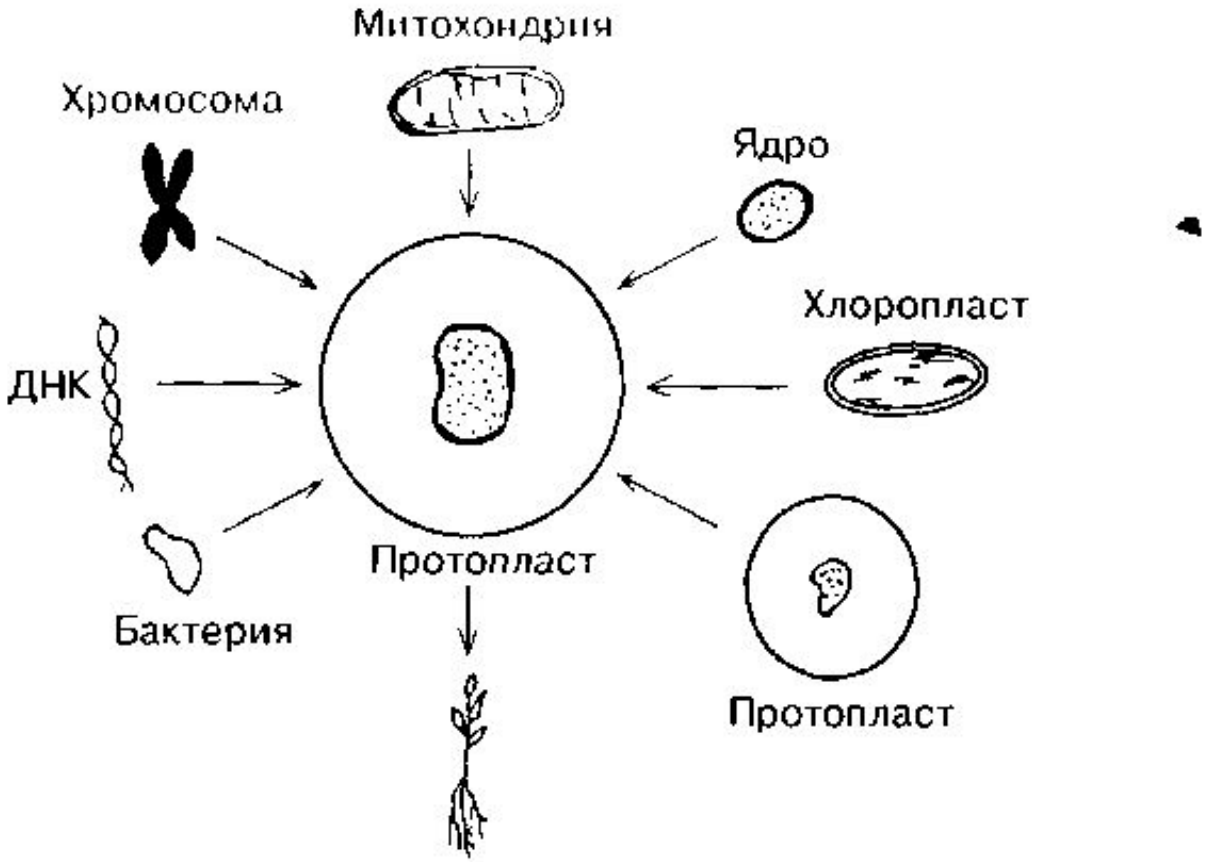


Рис. 36. *Клеточная инженерия на основе изолированных протопластов (19).*

- **Клеточная селекция**
  - **Применение культуры клеток растений в селекционных целях**

- Разнообразие (вариабельность) внутри клеточных линий или среди растений-регенерантов называют ***сомаклональной вариабельностью***, которая обусловлена, прежде всего, генетической гетерогенностью соматических клеток культуры, генетической и эпигенетической изменчивостью, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, а также генотипом и исходными характеристиками неоднородных эксплантов и отсутствием коррелятивных связей, что, видимо, является основной причиной спонтанной изменчивости клеток *in vitro* .

ДТ — исходный тип, цифрами обозначены номера линий

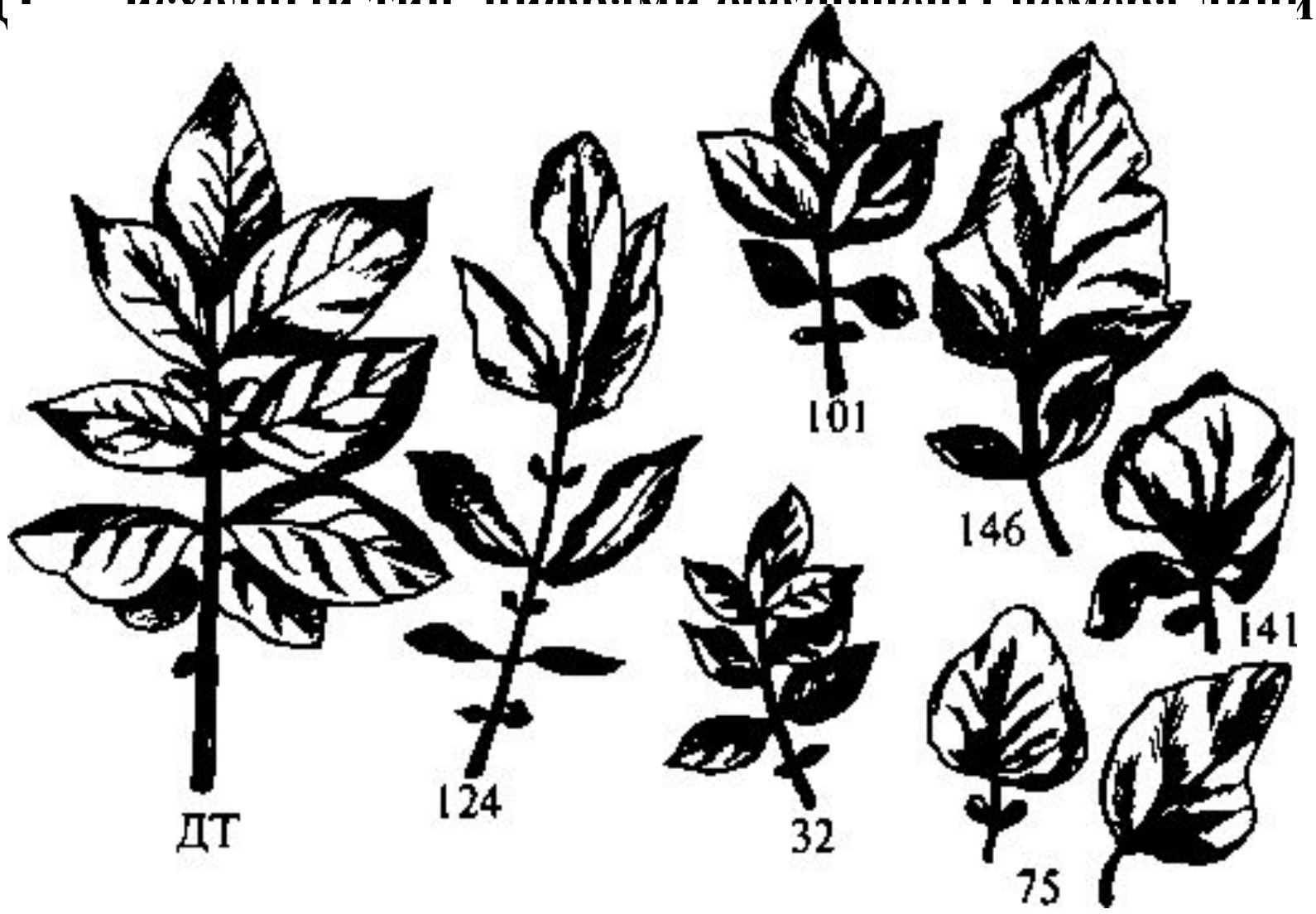


Рис. Изменение формы листьев у сомаклональных вариантов картофеля сорта Смена.
ДТ — исходный тип, цифрами обозначены номера линий (Л. Хромова и др., 1984)

- Клетки различного уровня плоидности различающиеся по скорости деления и роста, по устойчивости к неблагоприятным воздействиям конкуририруют, и одни из них начинают преобладать.
- Такой процесс возрастающего доминирования в популяции клеток определенного типа называется ***клеточной селекцией***. Доминирование может быть вызвано преимущественной пролиферацией одних клеток или успешной элиминацией (удалением) других.

- Клеточная селекция при спонтанном и индуцированном мутагенезе.

- ***Преимущества метода клеточной селекции***
- ***in vitro***

- По сравнению с экспериментальным мутагенезом на уровне целых растений метод мутагенеза на уровне клеток имеет ряд преимуществ:
- - экономится площадь, так как в одной чашке Петри диаметром 10 см можно культивировать 10^7 – 10^8 клеток, а для такого же количества растений необходима площадь свыше тысячи гектаров;
- - мутантные признаки на уровне отдельных клеток проявляются довольно быстро;
- - возможно получение новых типов мутаций, в том числе и биохимического характера;
- - экономится время и трудозатраты на получение нового желаемого признака.

- ***Селективные агенты и основные приемы*** для проведения клеточной селекции.
- Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объектов исследования могут быть использованы ***каллусные и суспензионные культуры или изолированные протопласты***. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Рис. 1. Схема получения мутантных форм путем клеточной селекции (по В. И. Артамонову, 1989)

Рис. Пути и направления селекции клеток растений in vitro,

Рис. Пути и направления селекции клеток растений in vitro, устойчивых к неблагоприятным факторам среды

• Микроклональное размножение

- В природе существует два способа размножения растений: половой (семенной) и вегетативный. Оба эти способа имеют как свои преимущества, так и недостатки.
- К недостаткам семенного размножения относятся генетическая пестрота семенного материала и длительность ювенильного периода.
- При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако большинство видов плохо размножается вегетативным способом, например, многие древесные породы. Так, эффективность размножения, даже на ювенильной стадии, дуба, сосны, ели, орехоплодных не очень высока. Кроме того, с помощью черенкования невозможно размножать многие виды древесных растений в возрасте старше 10-15 лет. Операции по размножению с помощью прививок сложны и трудоемки.

- Достижения в области биотехнологии культуры растительных клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – ***клонального микроразмножения.***
- Клональное микроразмножение – получение *in vitro* неполовым путем генетически идентичных исходному экземпляру растений. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. ***Термин «клон»*** был предложен **в 1903 году Уэбстером** (от греческого klon - черенок или побег, пригодный для размножения растений). В соответствии с научной терминологией клонирование подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток.

- Преимущества метода клонального микроразмножения.

- **Факторы, влияющие на процесс клонального микроразмножения**

- На эффективность микроклонального размножения влияет масса факторов различной природы. Это физиологические особенности вводимого в культуру растения, химические и физические условия культивирования. Наиболее важным моментом является выбор **материнского растения, экспланта и условия культивирования**.

- ***Этапы микроклонального размножения растений***

- Процесс микроразмножения можно разделить на 4 этапа:
- 1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.
- 2. Собственно микроразмножение, при котором достигается получение максимального количества меристематических клонов.
- 3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 °С, +10 °С).
- 4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.
-

  Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

- ***Методы клонального микроразмножения***
- Существует много методов клонального микроразмножения, а также различных их классификаций. Согласно одной из них, предложенной **Мурасиге в 1977 г.**, процесс можно осуществлять следующими путями:
- 1. Активация пазушных меристем.
- 2. Образование адвентивных побегов тканями экспланта.
- 3. Возникновение адвентивных побегов в каллусе.
- 4. Индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта.
- 5. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
- 6. Формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).

- **Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко (1983)** выделили два принципиально различных ***типа клонального микроразмножения***:
- 1. Активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля и интеркалярные зоны стебля).
- 2. Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo* :
- а) образование адвентивных почек и побегов непосредственно тканями экспланта;
- б) индукция соматического эмбриогенеза;
- в) дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

- Основной метод, использующийся при клональном микроразмножении растений – ***активация развития уже существующих в растении меристем***. Пути получения микроклонов.

уже существующих меристем:

1 – путем удаления верхушечной меристемы;

2 – добавлением цитокининов в среду.

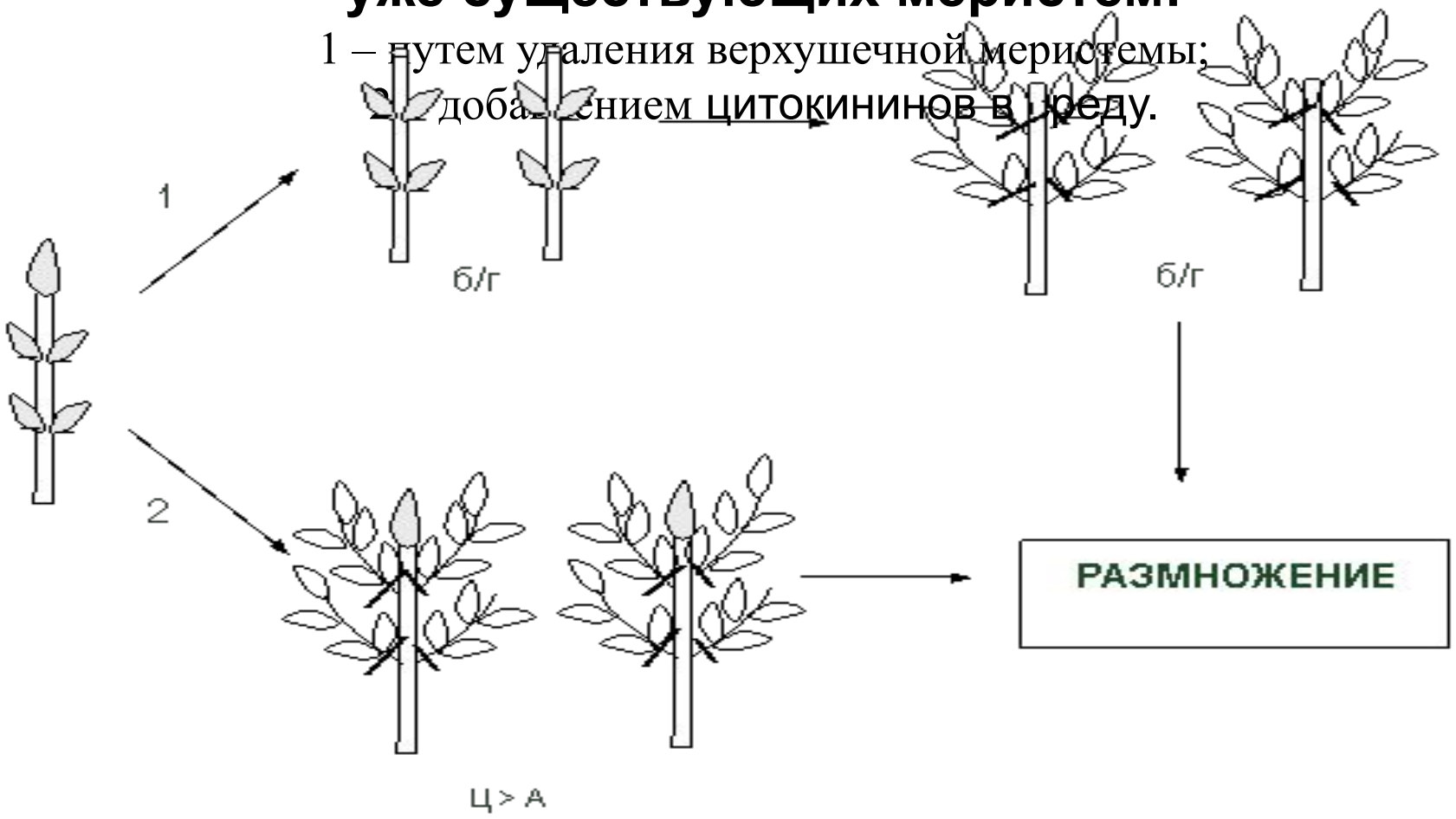


Рис. Схема размножения растений методом активации

уже существующих меристем:

1 – путем удаления верхушечной меристемы;

2 – добавлением цитокининов в среду.

Рис. Схема получения безвирусного семенного материала картофеля.

- ***Второй метод – индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта.*** Метод основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения.

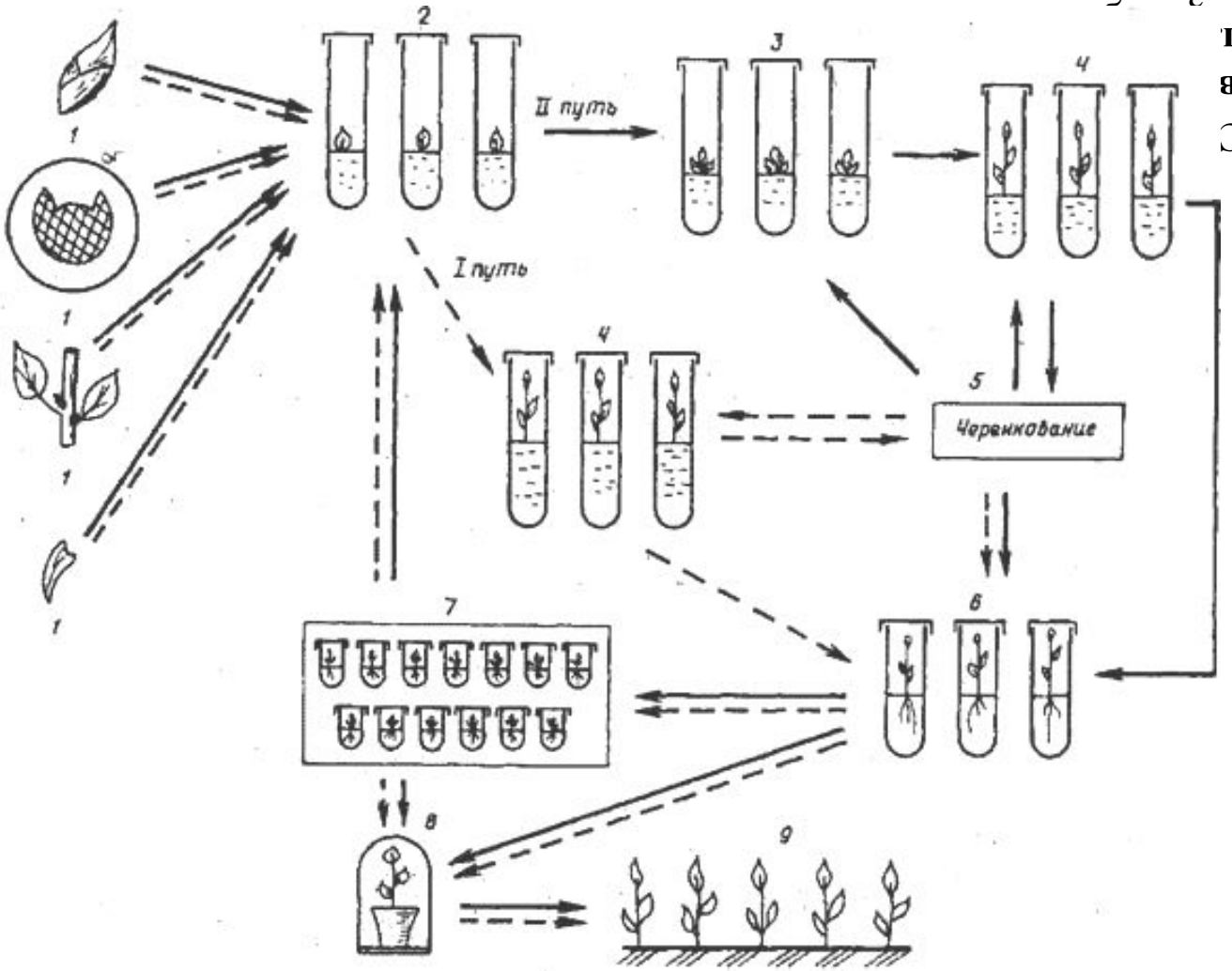
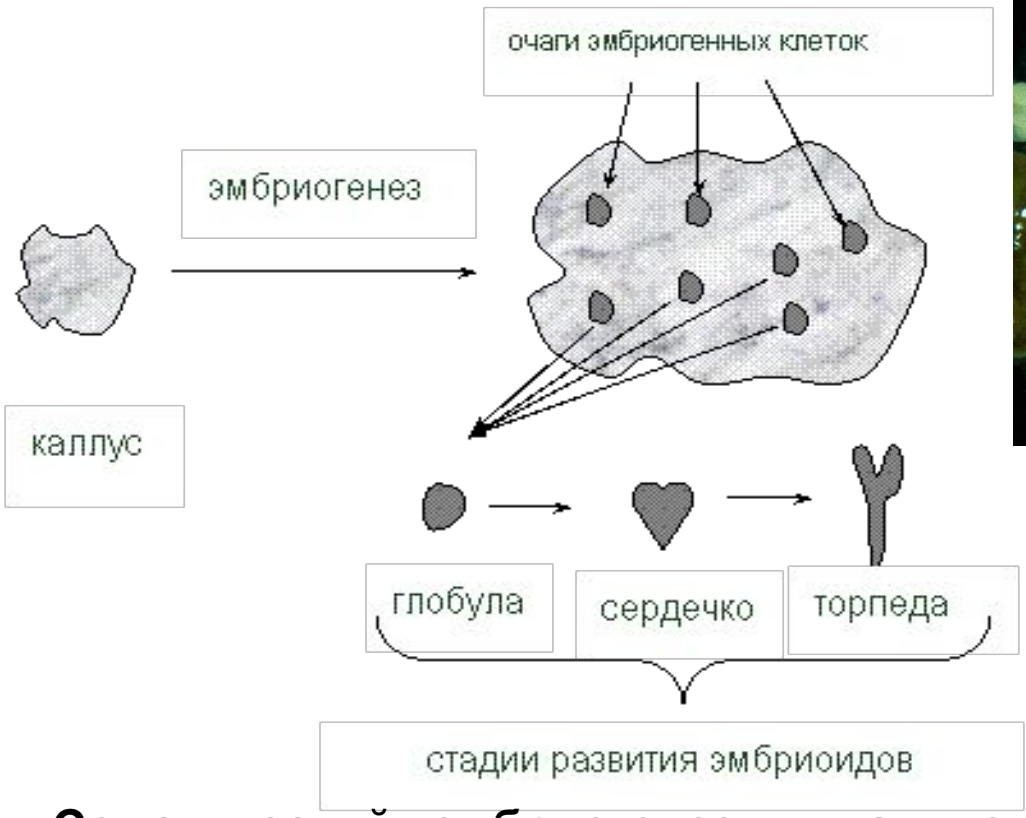


Рис. Схема клонального микроразмножения растений **методом активации развития существующих меристем** (1-й путь), **индукции возникновения адвентивных почек на экспланте** (2-й путь): 1 – выбор исходного экслантанта; 2 – получение стерильной культуры; 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 – рост почек и формирование микропобегов; 5 – размножение микропобегов; 6 – укоренение микропобегов; 7 – депонирование размноженных растений-регенерантов при пониженной температуре; 8 – перевод в тепличные условия; 9 – высадка растений в поле

- ***Третий метод*** основывается на ***дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур*** – **соматических эмбриоидов**, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название ***соматического эмбриогенеза***. В отличие от развития *in vivo*, соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня.

Рис. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани пшеницы

- Согласно **Стеварду**, соматические зародыши проходят 3 стадии развития: *глобулярную, сердцевидную, торпедовидную* и в конечном итоге имеют тенденцию развития в проросток, т.е. соматические зародыши представляют собой полностью сформированные зародыши.



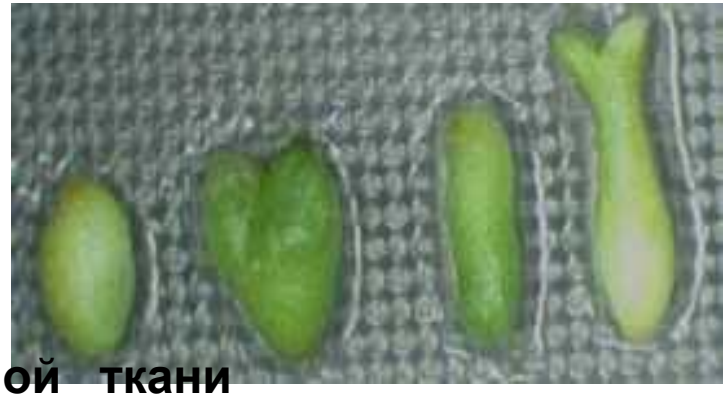


Рис. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани пшеницы

2-5 - сменяемые питательные среды, в которых развиваются каллусы, эволюционирующие в эмбриоиды (4) и затем - в молодые растеньица (5),

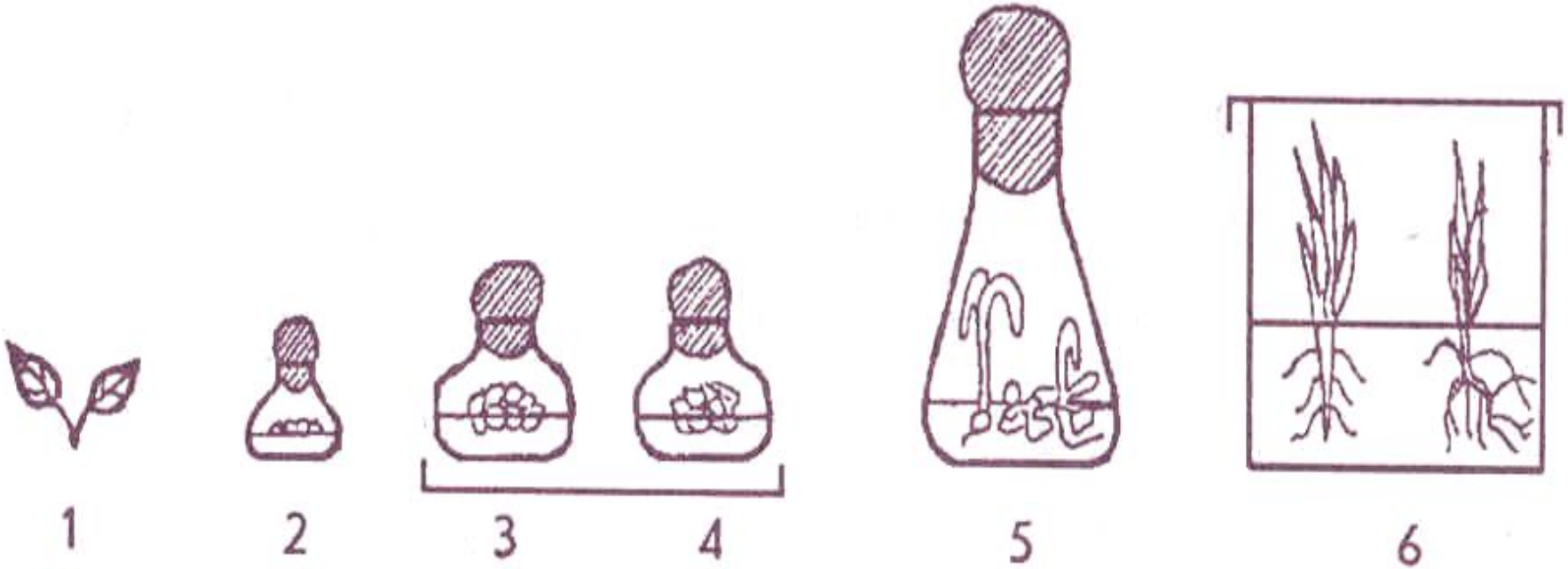


Рис. Процесс клонирования гвинейской масличной пальмы:
1 - верхушечные молодые листья (посевной материал),
2-5 - сменяемые питательные среды, в которых развиваются каллусы, эволюционирующие в эмбриоиды (4) и затем - в молодые растеньица (5),
6 - образование корней при очередном переносе растения на свежую питательную среду, из которой их пересаживают в грунт.

- ***Четвертый метод – дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани***.
- Ограничение в использовании метода связано с тем, что при частом пассировании и длительном культивировании каллусной ткани может изменяться плоидность регенерируемых растений, наблюдаются структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, утрата морфогенетического потенциала. Наряду с генетическими изменениями отмечаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев, образование укороченных междоузлий, пониженная устойчивость к болезням и вредителям.

в каллусной ткани

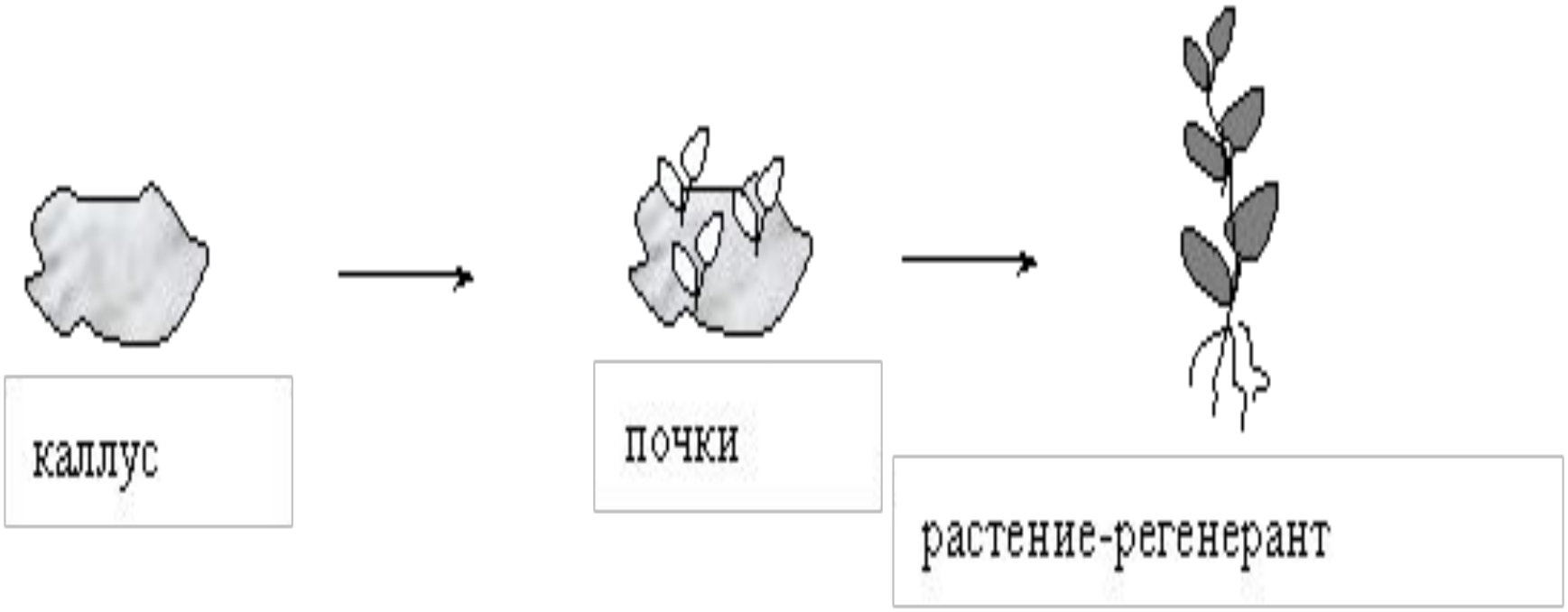


Рис. Дифференциация придаточных почек в каллусной ткани

• вспомогательные технологии

- В отдаленной гибридизации помимо **клонального микроразмножения ценных гибридов** находят применение такие методы культуры изолированных тканей, **как оплодотворение *in vitro*, эмбриокультура** (выращивание изолированных зародышей на искусственных питательных средах), **а также получение гаплоидов *in vitro* и криосохранение.**

- **Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости)** проводится в том случае, когда оплодотворение между выбранными растениями в естественных условиях невозможно, что может быть вызвано как физиологическими, так и морфологическими причинами.

- ***Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации***

- Генетическая или физиологическая несовместимость таксономически отдаленных партнеров может проявляться и после оплодотворения, что выражается в образовании щуплых невсхожих семян.
- **Эмбриокультура**.

• получение гаплоидов *in vitro*

- 1. Гаплоидные растения, т.е. растения, в клетках которых содержится половинный набор хромосом, широко используются в качестве посредников для получения гомозиготных изогенных стабильных линий, образуемых удвоением числа хромосом, из которых в дальнейшем получают гетерозисные гибриды. Изогенные линии на основе удвоенных гаплоидов можно создавать в течение года, тогда как традиционный метод инбридинга требует для этого 4-6 лет.
- 2. У перекрестноопыляющихся растений в результате удвоения числа хромосом гаплоидов получают чистые линии, имеющие самостоятельную ценность.
- 3. Гаплоидные клетки и растения позволяют легче обнаружить рецессивные мутации. После использования мутагенеза определяют в гаплоидах рецессивные мутации и затем получают стабильные линии с ценными мутантными признаками.

- 4. В гаплоидных клетках и растениях гораздо быстрее обнаруживаются не только рецессивные мутации, но и редкие рекомбинации генов, а также экспрессия введенного извне генетического материала, которые в обычных диплоидных растениях проявляются только во втором поколении при расщеплении. Это позволяет в 2-3 раза ускорить процесс создания сорта.
- 5. В результате гибридизации гаплоидов с диплоидными видами получают:
- а. моногаплоиды, в которых происходит утрата некоторых хромосом, что используется в моносомном генетическом анализе;
- б. гетерозисные триплоидные формы.
- 6. Гаплоиды используются для получения карликовых и других необычных форм декоративных растений.
- 7. Гаплоидия применяется также и при отдаленной гибридизации.

В настоящее время применяют следующие методы индуцирования гаплоидов:

- 1. **Псевдогамия (женский партеногенез)** – развитие гаплоидного зародыша после опыления инородной пыльцой без оплодотворения яйцеклетки. **Гиногенез** – развитие гаплоидных растений из изолированной семяпочки.
- 2. **Селективная элиминация хромосом** в гибридном зародыше.
- 3. **Индуцированный андрогенез** в культуре пыльников и пыльцы.

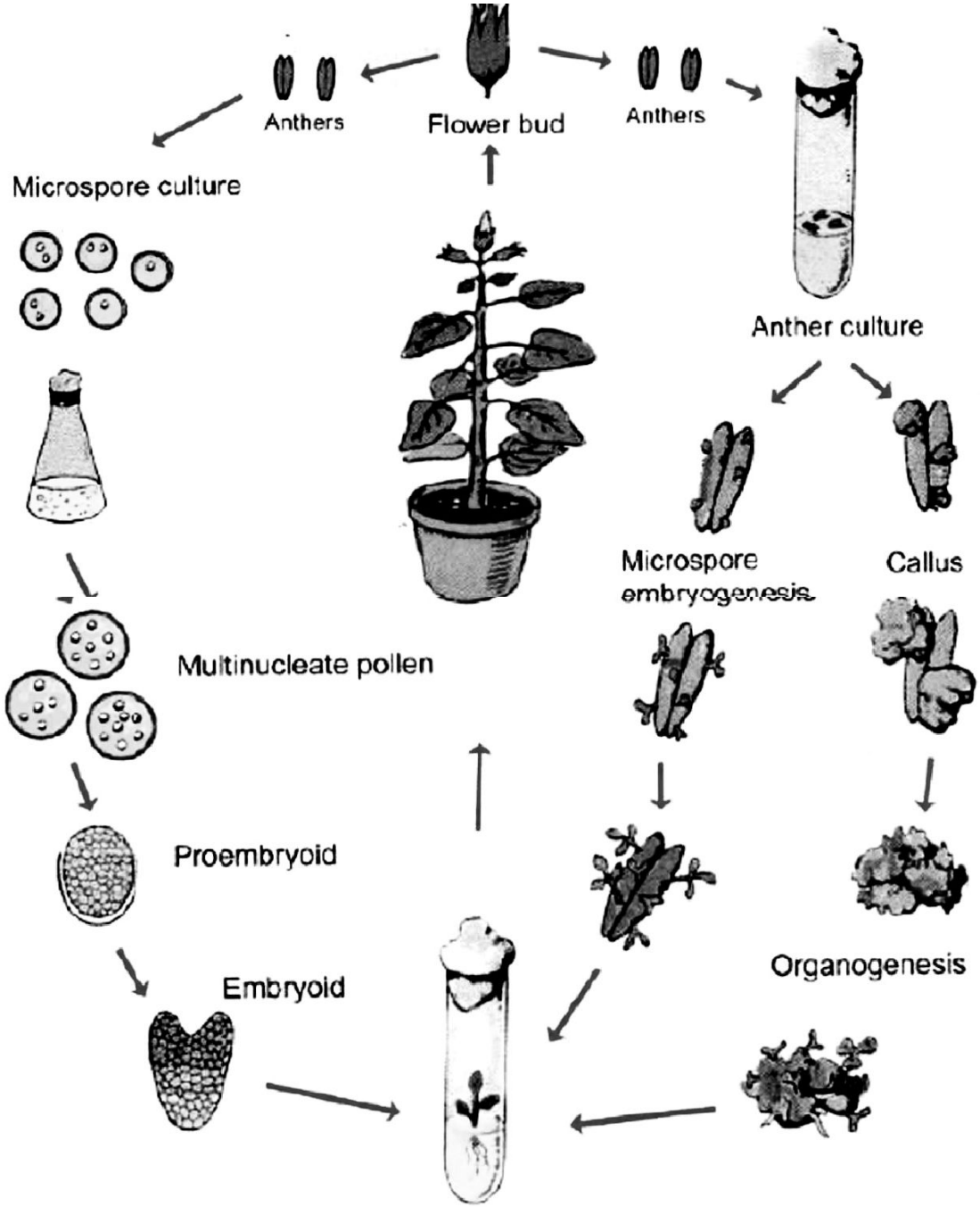


Рис. Схема получения гаплоидных растений в культуре пыльников и микроспор

Культура пыльников

- Для культуры пыльников используют целые пыльники, стерильно выделенные из бутонов в определенной фазе развития. Их помещают на твердую питательную среду либо на поверхность жидкой питательной среды. В редких случаях культивируют бутоны или соцветия.

Культуры пыльников на питательных средах

Культуры пыльников на питательных средах

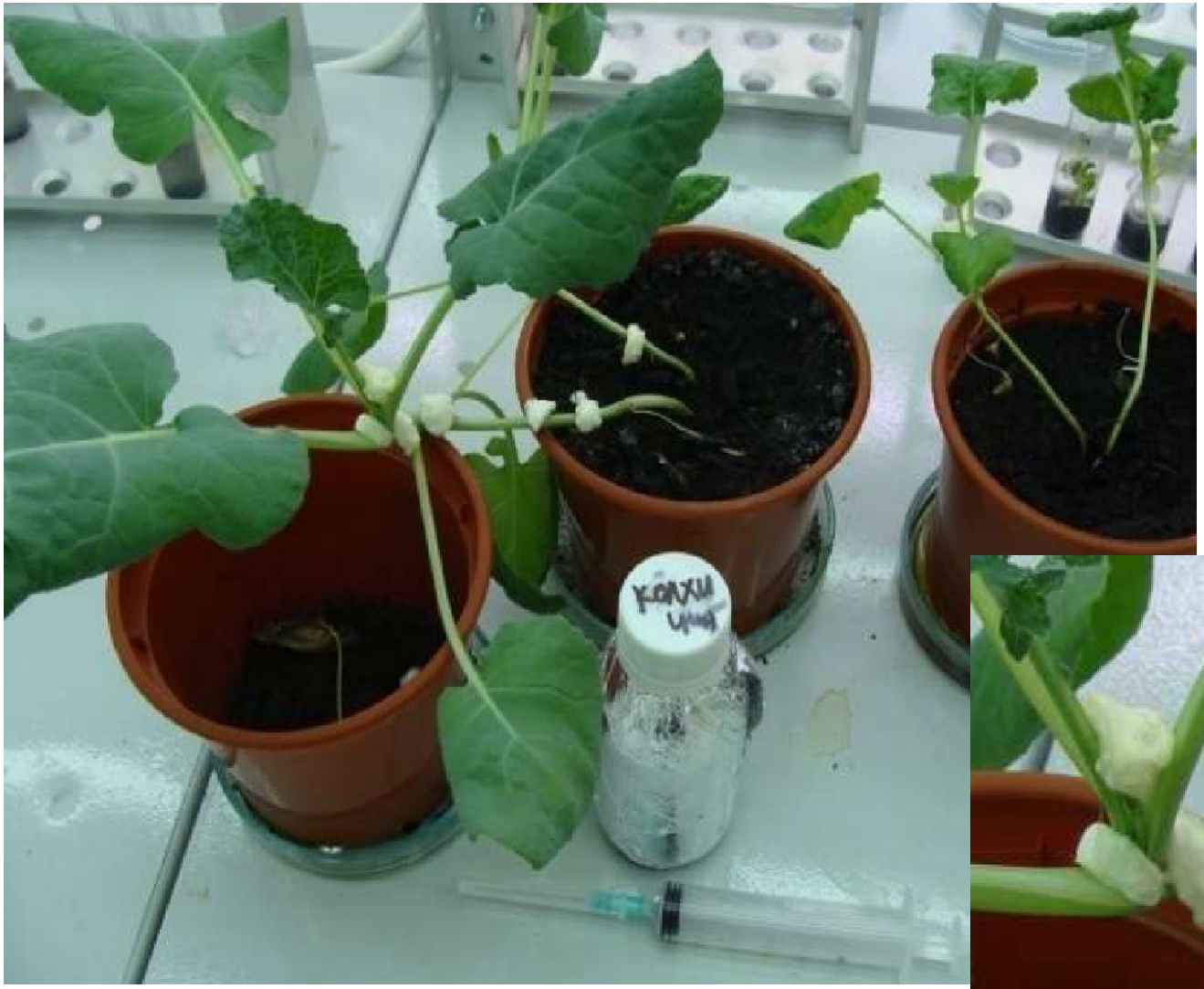
• Культура пыльцы

- Несмотря на теоретическую привлекательность, этот метод применим лишь для отдельных видов (морковь, табак). Однако даже у них конечный выход растений-регенерантов на один пыльник обычно ниже, чем из микроспор, развивающихся внутри пыльника. А у злаков микроспоры невозможно отделить от других тканей пыльника без резкого снижения их жизнеспособности, а значит, выживаемости и развития в культуре.

- Методы отделения пыльцы от соматических тканей пыльника.

- Создание фертильных дигаплоидов.

- **Обработка растений-регенерантов рапса раствором колхицина**



- **Криосохранение растений**

- **Цель данной технологии -** сохранение в культуре in
- vitro генофонда и обеспечение селекционеров в
- любое время генотипом, имеющим искомые
- признаки:
- **1) необходимая пыльца для проведения гибридизации;**
- **2) уникальные и единичные семена, в том числе не**
- **выносящие обезвоживания;**
- **3) трансформированные, мутантные, гибридные клетки**
- **разных видов растений, способных к морфогенезу in**
- **vitro;**
- **4) зиготические и соматические зародыши и т. д.**

• Криосохранение генофонда

- Цель создания коллекций и банков клеток растений – обеспечение биотехнологов нужным для работы генотипом. В любое время сохраняются редкие и исчезающие виды, сохраняются растения, размножающиеся как вегетативно, так и семенами (это особенно важно для поддержания гетерозисных гибридов), таким образом сохраняются те уникальные генотипы, свойства которых были бы потеряны при половом размножении. Сохраняются также линии клеток и каллусов, синтезирующих ценные продукты вторичного метаболизма.
- Криосохранение – это обычно хранение при очень низких температурах: при температуре сухого льда (-79 °С), в морозильниках с ультранизкой температурой (-80 °С и ниже), в парах (-140 °С) или непосредственно в жидком азоте (-196 °С).

- **Криосохранение пыльцы и семян**

- Наиболее проста техника криосохранения пыльцы. Для этого подсушенную пыльцу помещают в запечатанные пластмассовые ампулы и переносят в жидкий азот.
- Успехи криоконсервирования семян в значительной мере зависят от степени их влажности, верхней границей которой является 10-15%. Это связано с тем, что в достаточно сухих семенах вода является связанной, не способной замерзать. Как только при намачивании и набухании семян появляется свободная вода, в них образуется лед при замораживании, который приводит к механическим повреждениям клеток и к их гибели.
- Установлено, что большинство видов растений имеют семена, которые можно легко высушить до низкой влажности (10-13% и ниже) без существенной потери их всхожести. Такие семена могут быть сохранены в жидком азоте путем прямого погружения после предварительного высушивания в вакууме. Однако существует нижний предел допустимой влажности 4-7%. При высушивании семян ниже 4% наблюдаются повреждения, связанные с аутоокислением липидов в меристематических зонах зародыша.
- Относительно скорости оттаивания семян после их замораживания некоторые авторы считают более безопасным медленное оттаивание на воздухе при 0 °С; другие же предпочитают быстрое погружение их в жидкий азот с последующим быстрым оттаиванием.
- В настоящее время при глубинном замораживании семян используют методику японских исследователей **Сакан и Ноширо** (**1975**).

- **Криоконсервирование клеток и тканей растений**
- Значительно сложнее стоит проблема криоконсервации клеток растений. Наибольшие трудности здесь связаны с процессом замораживания, так как клетки растении имеют свою специфику. Они обладают большими размерами, сильной вакуолизацией, обилием воды и чрезвычайной шпротой и пластичностью их метаболизма, поскольку находятся в значительно более изменчивых условиях, чем, например, клетки животных. В этой связи выживаемость клеток растений даже в лучших (редких) случаях не превышает 69-70%.
- Успех низкотемпературного криоконсервирования зависит от целого ряда факторов: генетических и морфологических особенностей клеток, состава среды консервирования, вида и концентрации криопротектора, режима охлаждения и условий оттаивания, способности к закаливанию и уровня проницаемости криопротектора.

- Повреждении клеток при замораживании и последующем оттаивании зависит, с одной стороны, от образования льда внутри них (механический стресс), а с другой - от их обезвоживания (осмотический стресс).
- Быстрое охлаждение вызывает более раннее замораживание клеток изнутри и меньшее обезвоживание.
- Замороженные культуры необходимо хранить при низкой температуре, по крайней мере, при -100 °С. На практике для этого удобнее всего использовать жидкий азот (-196 °С) или его пары (-150 °С).

- При слишком медленном оттаивании клеток в них происходит повторное образование льда, оказывающее повреждающее действие. Поэтому предпочтительнее использовать быстрое оттаивание. Для этого ампулы встряхивают в воде с температурой 40 °С, иногда 60 °С. Но как только начинает исчезать последний кристаллик льда в ампуле, ее переносят в сосуд со льдом.
- Отмывание от криопротектора применяется только в случае использования веществ, токсичных для данных клеток. Содержимое ампулы разбавляют в 3-4 приема с 15-минутными интервалами большим объемом холодной питательной среды или 3-15%-ной сахарозы. Повышенная концентрация сахарозы полезна для замедления деплазмолиза, если криопротектор вызвал плазмолиз. Затем клетки отстаивают, а надосадочную жидкость заменяют питательной средой, объем которой приблизительно равен исходному объему суспензии. Возобновление роста культур требует 2-3 недель.

- Этапы криосохранения:

- 1 – подготовка растительной ткани к замораживанию (культивирование на питательных средах с криопротектором: диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), глицерин (10-20%), а также непроникающие высокомолекулярные - поливинилпиролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000, медленное замораживание;
- 2 – хранение в жидком азоте (-196 °С);
- 3 – размораживание (на водяной бане)

• Культуры животных клеток

- Идея о том, что клетки тканей животных можно выделить из организма и затем создать условия для роста и воспроизводства их *in vitro*, возникла на базе концепции, принадлежащей **К. Бернару**.
- Чуть позже, **в 1885 г., Ру** показал возможность сохранения вне организма живых тканей на практике. Он в течение нескольких дней поддерживал в жизнеспособном состоянии нервную пластинку куриного эмбриона в теплом солевом (физиологическом) растворе. Позднее, в **1897 г., Леб** поддерживал в жизнеспособном состоянии клетки крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови. **Льюнгрен (1898)** показал возможность поддержания эксплантатов кожи человека в жизнеспособном состоянии в кислой среде с сохранением способности к реимплантации. **Джолли (1903)** наблюдал деление клетки в висячей капле, содержащей лейкоциты саламандры, а **Биб и Эвинг (1906)** подтвердили это в экспериментах с лимфосаркомной тканью собаки.

- Продолжая работы Ру, **Росс Гаррисон** усовершенствовал методику «висячей капли». Он использовал небольшие кусочки ткани, отторгнутые от медуллярной пластинки эмбриона лягушки и внедренные в ее лимфатический тромб (сгусток лимфы), и выдерживал их в виде капли на нижней стороне покровного стекла, расположенного поверх лунки в предметном стекле. В **1907 г**. ему удалось наблюдать с помощью такой «камеры» рост нервных клеток в течение нескольких недель; он установил, что скорость роста этих клеток составляет 20 мкм за 25 мин. Эксперименты Гаррисона были направлены на получение ответов на вопросы, относящиеся к физиологии нервных клеток лягушки, однако воспроизводимая методика, которой он предложил, была применена **Берроузом** для других клеток тканей теплокровных животных. Этот исследователь **в 1910 г**. вместо лимфатического тромба использовал сгусток плазмы курицы.

- **В 1913 г. Алексис Каррель** применил плазму крови, обогащенную эмбриональным экстрактом. Примененная методика обеспечивала значительно большую вероятность успеха, чем та, которую использовала **Рид (1908),** пытавшиеся выращивать клетки костного мозга морской свинки на среде определенного состава. Инкубация клеток сердца куриного эмбриона была начала 17 января 1913 г. Пересев клеток продолжил **Эблинг**, работая с ними 34 года. Поскольку Каррель был хирургом, весьма сведущим в вопросах асептики, он смог внести существенный вклад в культивирование клеток животных *in vitro*.
- В ходе дальнейших работ был внесен ряд поправок в рецептуру среды культивирования. В частности, **Тирод** модифицировал **раствор Рингера** и в дополнение к куриной сыворотке и эмбриональному экстракту стал использовать коагулят фибрина**.** В этот же период был разработан очень существенный подход в технике работы с клетками – ***трипсинизация*** – для высвобождения клеток из тканевой матрицы. Однако эта методика не находила признания до тех пор, пока **в 1937 г. Симмс** и **Стидлман** не использовали ее для пассирования клеток. Эта методика дает возможность успешно применять в культурах индивидуальные клетки, а не ткани.

- Впервые клоны клеток в культуре из одиночной клетки были получены **Эрлом с сотрудниками в 1948 г.**
- Первые суспензионные культуры клеток животных, полученные в **1953 г. Оуенсом и сотрудниками**, основывались на клетках злокачественных тканей. Это – клетки **HeLa**, выделенные из раковой опухоли шейки матки человека. Перевиваемая линия клеток карциномы шейки матки была выделена еще **в 1952 г. Джеем** с сотрудниками и используется в настоящее время во многих лабораториях мира.
- **Игл (1955)** систематически исследовал пищевые потребности клеток человека и мыши.
- До тех пор, пока в **1961 г. Хейфлик** и **Мурхед** не выделили линию диплоидных клеток человека (**НДС**) **WI-38**, считалось, что один раз установившаяся клеточная линия имеет неограниченное время жизни. Относительно линии WI-38 было показано, что период ее существования в культуре ограничивается приблизительно 50 генерациями. Перед отмиранием популяции для клеток этой линии характерен феномен старения. Однако при отмирании эти клетки оставались диплоидными и не имели признаков злокачественных изменений. **Предел,** или **лимит, Хейфлика.**

- Последующий этап в истории культивирования диплоидных клеток человека связан с установлением факта, что они являются генетически стабильными и свободными от всех известных латентных и онкогенных вирусов. Поэтому линии диплоидных клеток человека разрешено применять для получения продуктов, предназначаемых для людей. Эта догма остается действующей и в настоящее время, хотя дальнейшие исследования отчетливо показали присутствие в клетках, выделенных из нормальных тканей, потенциальных онкогенов, идентичных тем, которые найдены в таких известных онкогенных вирусах, как вирус саркомы Рауса и вирус саркомы Молони.

- В настоящее время практически любые клетки человека и животных могут быть введены в культуру и, тем самым, служить средством и объектом во многих исследованиях. Благодаря культивированию клеток возможности исследования и диагностики расширяются почти беспредельно, так как имеется возможность оценки не только морфологических и биохимических изменений, но и изменений в поведении клеток, их реакции на различные агенты, в том числе и на лекарственные воздействия.
- Наиболее часто культивируются следующие элементы:
- *соединительной ткани – фибробласты;*
- *скелетной – кость и хрящи;*
- *мышечной – скелетные, сердечные и гладкие мышцы;*
- *эпителиальной – печень, легкие, кожа, мочевой пузырь, почки, молочная железа;*
- *нервной – глиальные клетки и нейроны (хотя они лишены способности к пролиферации);*
- *эндокринной системы – гипофиз, надпочечники, клетки островков Лангерганса;*
- *различные типы опухолевых клеток.*

- Наибольшее распространение получили культуры **фибробластов**. Широкое использование фибробластов обусловлено не только легкостью их культивирования, но и тем, что соединительная ткань, главным клеточным элементом которой они являются, составляет значительную часть массы тела. Фибробласты in vitro сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме, а также онтогенетические и индивидуально-генотипические свойства организма-донора. Не существует другого такого типа клеток, который в полной мере мог бы представлять свойства клеток организма. Изменения, которые возникают при введении фибробластов в культуру, можно легко контролировать и свести к минимуму при создании соответствующих условий.
- **Гринбергом в 1978 г.** была доказана возможность экстраполяции данных, полученных на культивируемых фибробластах, на условия *in vivo*.

• Культуральные системы животных клеток

- По характеру и длительности существования культуры животных клеток можно подразделить на **первичные** и **перевиваемые**.
- **Первичной** называют клеточную культуру, полученную непосредственно от животного и имеющую ограниченный срок существования.

- Культуры клеток принято разделять на ***перевиваемые клетки***, характеризующиеся потенциальным бессмертием и, как правило, гетероплоидным кариотипом (клеточные линии), и ***полуперевиваемые клетки*** с диплоидным набором хромосом и ограниченной продолжительностью жизни, выгодно сочетающие черты первичных и перевиваемых клеток.
- ***Первичные культуры*** после пересева становятся ***вторичными культурами***. В таких культурах также появляются клетки, дающие начало диплоидным и постоянным культурам. Культуры перевиваемых клеток, способные к автономному существованию и бесконечно долгому размножению называются ***трансформированными.***
- Другим источником постоянных клеточных линий являются злокачественные новообразования, клетки которых уже трансформированы in vivo при развитии патологического процесса.

- Таким образом, различают 3 основных типа культур животных клеток: **первичные культуры**, получаемые практически из любого органа и существующие лишь до первого пересева; **диплоидные культуры**, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие до 50 пересевов диплоидный набор хромосом, и трансформированные **постоянные** гетероплоидные **культуры**, способные к существованию вне организма неограниченно долгое время.
- Кроме того, культуры тканей могут подразделяться *по виду животного*, от которого они происходят; *по типу ткани-источника*; *по состоянию ткани на момент извлечения* (нормальные, опухолевые), *по способу выращивания* (монослойные, суспензионные, на микроносителях и т. п.).
- Главным фактором при выборе ткани или линии клеток для дальнейшей работы является природа процесса, который будет осуществляться с использованием этих клеток.

- ***Получение клеточных линий на основе клеток***
- ***первичных и диплоидных культур***
- Первичные культуры клеток получают путем стерильного удаления фрагмента ткани и его **механической** или **ферментативной дезагрегации**.

- **Постоянные культуры**

- У полученных клеточных линий есть 2 пути: После нескольких пересевов линия клеток 1. либо гибнет (**ограниченная линия клеток**), 2. либо трансформируется и становится **постоянной клеточной линией**. К настоящему времени существует около 500 постоянных клеточных линий, полученных от более чем 40 видов животных.

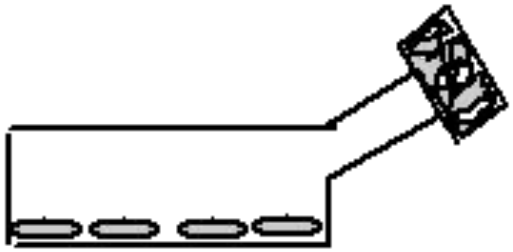
- Постоянные клеточные линии имеют ***определенные преимущества***: высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности и, следовательно, более высокого выхода биомассы; возможность использования более дешевых сред; способность к суспензионному росту.
- Но и ***недостатки*** – повышенная хромосомная нестабильность, отклонение от фенотипа донора, утрата специфических маркеров.

- **Системы культивирования клеток**

- Существует 2 основных системы культивирования клеток.
  1. **Непроточные культуры** - тип культур, в котором клетки вводят в фиксированный объем среды. По мере роста клеток происходит использование питательных веществ и накопление метаболитов, поэтому среда должна периодически меняться, что приводит к изменению клеточного метаболизма, называемого еще и физиологической дифференцировкой. Со временем, в результате истощения среды происходит прекращение пролиферации клеток.

- Увеличить продолжительность жизни непроточных культур можно несколькими способами:
  прерывистый; ***постоянный***; ***перфузионный***.

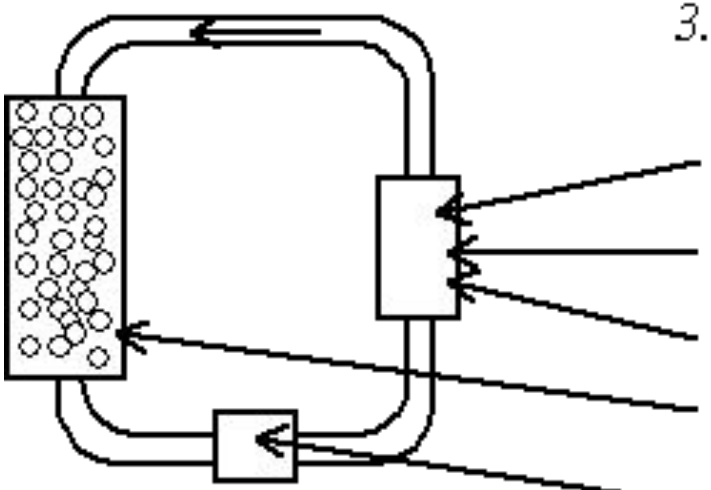
- 2. **Проточные культуры** обеспечивают истинные гомеостатические условия. Характеризующиеся постоянством концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Гомеостаз обусловлен постоянным вхождением среды в культуру и одновременным удалением равного объема среды с клетками. Такие системы пригодны для суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях.
- Существует 2 основных способа культивирования животных клеток: ***монослойные культуры и суспензионные культуры***.
- *Суспензионные культуры* предпочтительнее с точки зрения увеличения выхода клеток.



1. Чашка Колле, плоский флакон с клетками на дне

2. Вращающаяся бутыль (круглый сосуд) с клетками на дне и стенках

3. Колонка с клетками на микроносителях



pH, давление, CO_2, температура

система контроля и регенерации среды

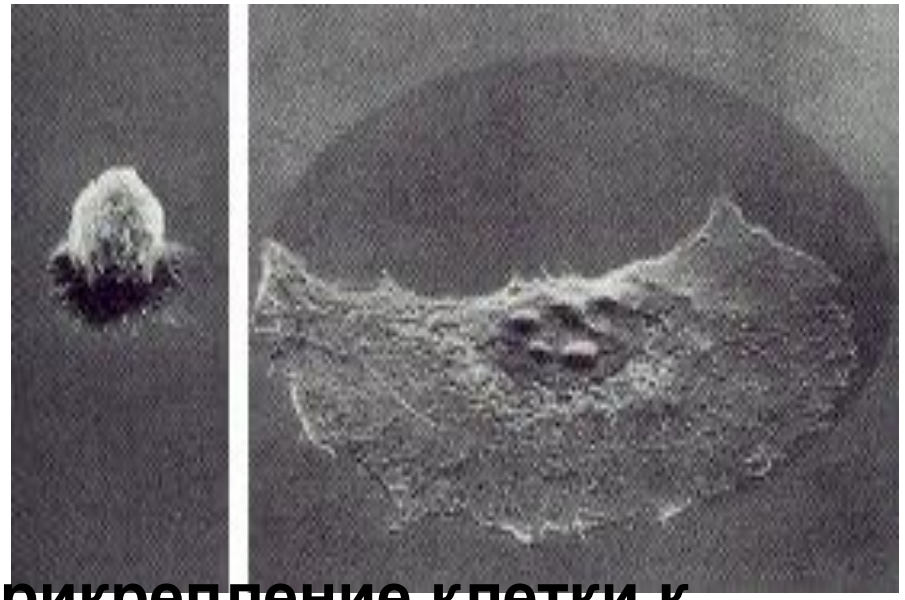
компоненты питательной среды

стеклянные бусы

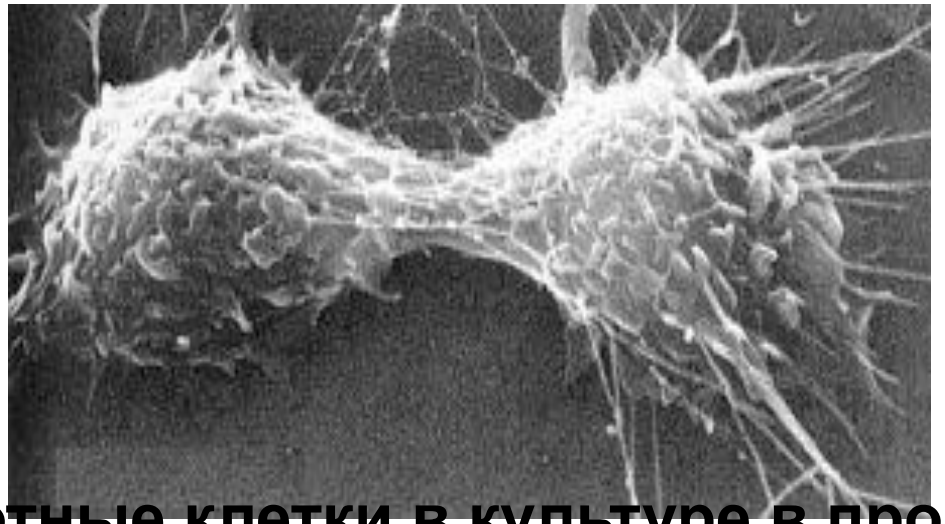
перистальтический насос

- **Монослойные культуры**

- Большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти только в виде монослоя, будучи прикрепленными к субстрату – к другим клеткам либо к стеклу (алюмо-боросиликатное стекло типа пирекс), пластику (полистирол, полиэтилен, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон, целлофан и др. при условии правильной обработки этих полимеров) - пластиковая поверхность должна быть специально обработана, чтобы клетки могли к ней прикрепиться, причем клетки эукариот не прикрепляются к пластиковым чашкам, предназначенным для бактериальных культур) или металлу – качественная медицинская нержавеющая сталь или титан.



Прикрепление клетки к субстрату

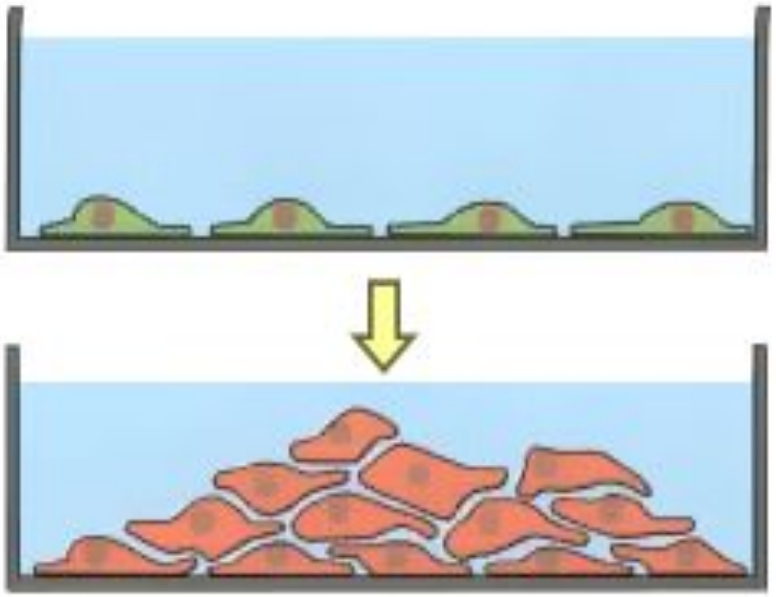


Животные клетки в культуре в процессе деления

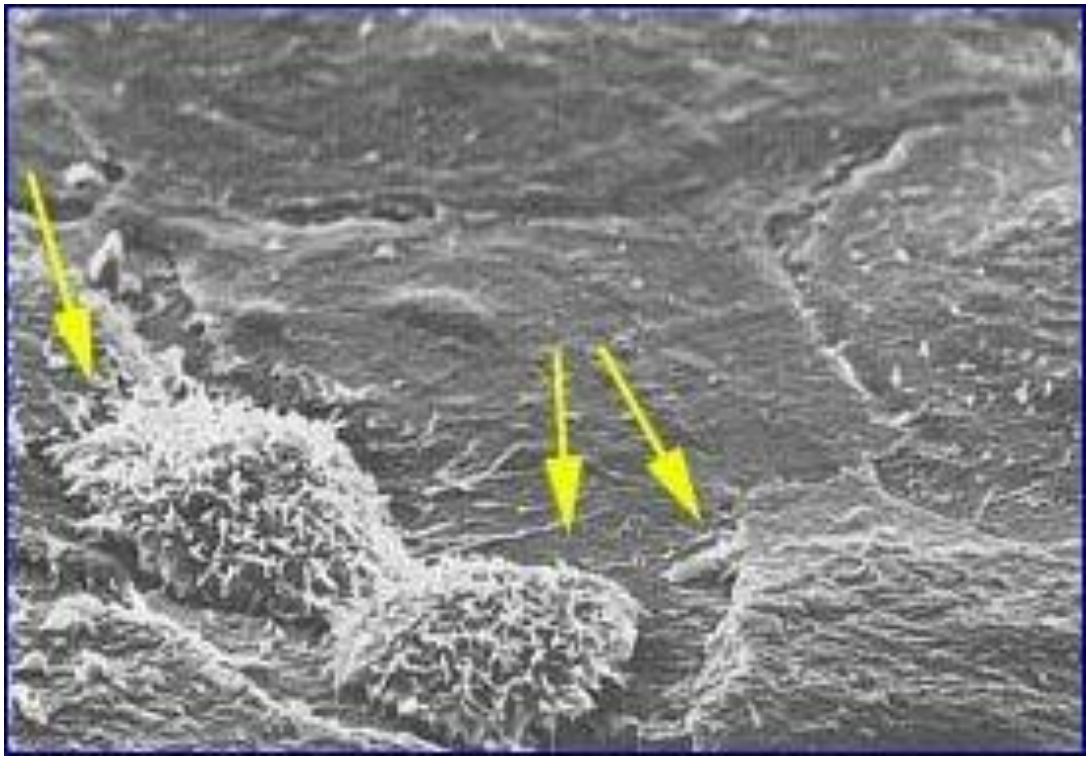
- Первичные клетки, которые делятся в культуре, могут претерпевать так называемое **контактное торможение**.

показаны места "нарастания" клеток друг на друга

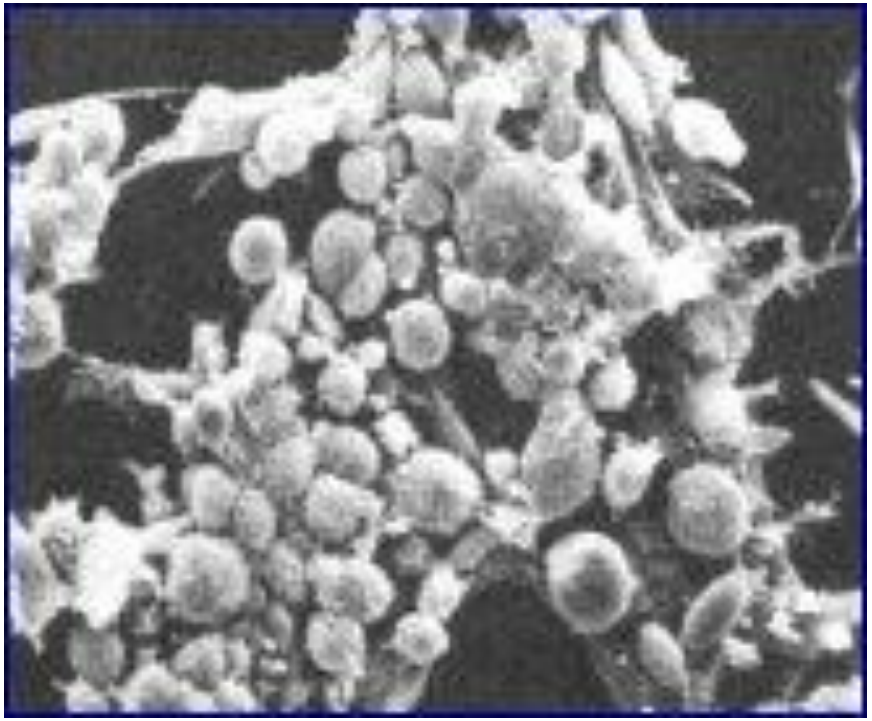
Раковые клетки продолжают расти и после того, как заполнят всю поверхность субстрата, образуя мультислой

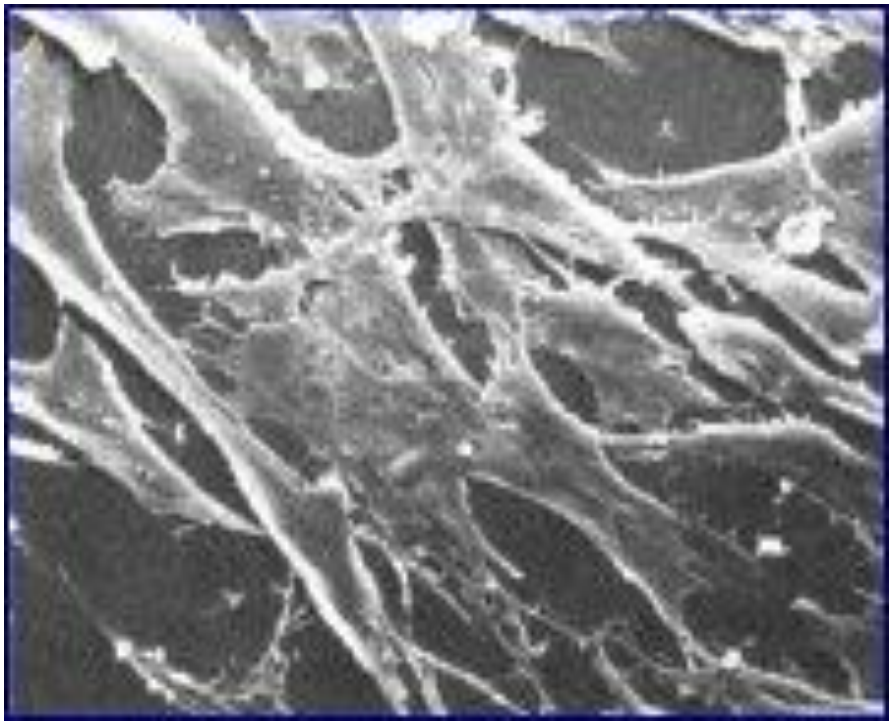


Линии клеток А431: эпидермальной карциномы человека. Стрелками показаны места "нарастания" клеток друг на друга



- **Клетки, трансформированные in vitro ретровирусом (вирус саркомы Рауса), несущим температурочувствительную мутацию в онкогене.**



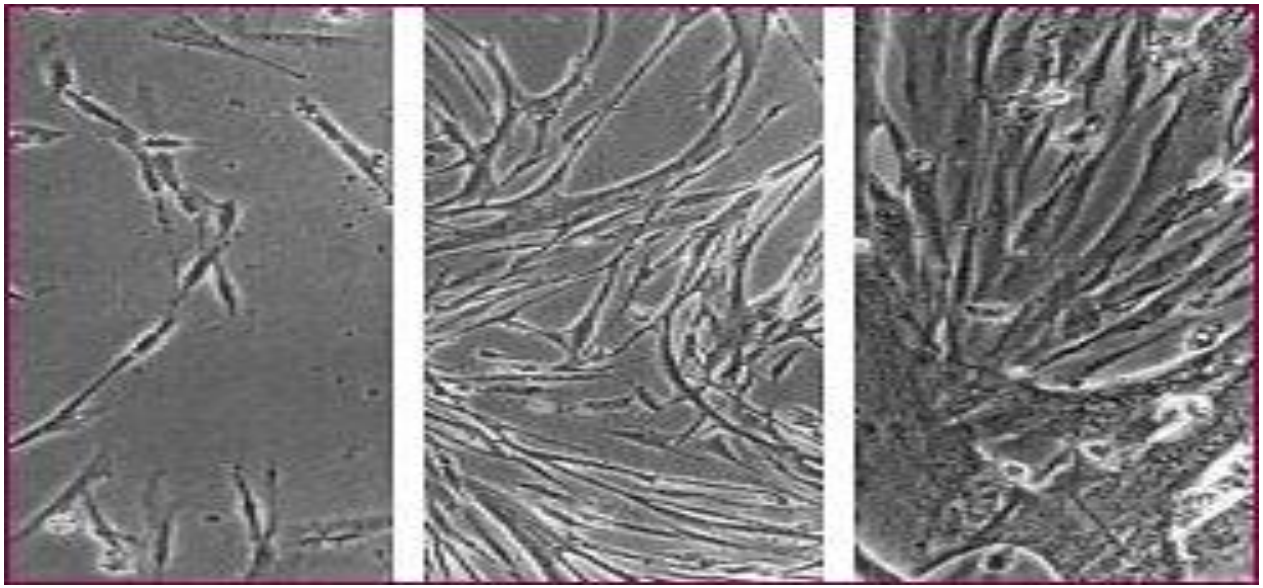


- Округленная форма трансформированных клеток (34 °С) Те же клетки приобретают нормальную морфологию, когда продукт онкогена инактивируется повышением температуры (39 °С)

- Если из плотного монослоя нетрансформированных клеток удалить часть пласта, то в клетках, находящихся по краям удаленного участка, происходит стимуляция синтеза ДНК и делений. В результате клетки быстро зарастают освободившуюся поверхность.

Формирование плотного монослоя миобластов

- Клеточную культуру перевивают после достижения ее плотного монослоя или когда добавленный в среду индикатор (обычно феноловый красный) меняет цвет с ярко-красного до желто-оранжевого.



Формирование плотного монослоя миобластов

Образование монослоя кератиноцитов из кожи лица взрослых доноров на 1, 3, 6 сутки

Образование монослоя кератиноцитов из кожи лица взрослых доноров на 1, 3, 6 сутки

- **Суспензионное культивирование**

- В 1953 г. **Оуенс с сотрудниками** получили первые суспензионные культуры животных клеток, которые удобнее использовать для наращивания клеточной массы.
- Как правило, клетки, отделившиеся от субстрата, на котором они росли, неспособны к росту в суспензии и быстро деградируют. Но если некоторые клетки культивировать во вращающемся флаконе (2 об\мин), не дающем возможности прикрепления клеток к поверхности, в среде, содержащей метилцеллюлозу, предотвращающую агрегацию клеток, можно получить жизнеспособные суспензионные клеточные штаммы. Метилцеллюлоза в концентрации 0,1-0,2% обладает максимальным протективным действием на взвешенные клетки, т.к. ее молекулы образуют вокруг клеток защитный слой препятствующий не только агрегации, но повреждениям при перемешивании.

- Суспензионное культивирование дает по меньшей мере 2-3-х кратную экономию питательных сред, по сравнению с общепринятым стационарным культивированием с полным исключением дорогостоящих протеолитических ферментов и буферных растворов. Кроме того суспензионные культуры представляются предпочтительными с точки зрения выхода клеток.
- Суспензионные культуры широко используется в вирусологических исследованиях и для накопления больших количеств вируссодержащего материала, при изготовлении вакцин и диагностических препаратов.

- **Монослойное культивирование на микроносителях**

- Сочетать положительные стороны монослойного и суспензионного культивирования позволяет использование системы с микроносителями. Способ был предложен в 1967 г. Ван Везелом. Микроносители – мелкие твердые частицы (поддерживаемые в суспензии благодаря перемешиванию), на которых клетки растут в виде монослоя. Использование микроносителей дает клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур.
-

- Преимущества:
- создание одинаковых контролируемых условий во всем объеме сосуда;
- получение высокой плотности клеточной популяции (до нескольких млн в 1 мл) и одновременное культивирование огромного числа клеток;
- постоянный контроль за динамикой роста клеток;
- снижение контаминации с связи с сокращением числа операций;
- экономия питательных сред;
- возможность пассирования клеток без трипсинизации путем добавления новых микроносителей и др.

- **Требования к микроносителям:**

- Микроносители не должны быть:
- - токсичными,
- - не сорбировать компоненты питательных сред и продукты метаболизма клеток,
- - должны иметь повехностный заряд или обменную емкость, достаточную для прикрепления клеток, возможность многократного использования.

- Коммерческие классические микроносители имеют диаметр 100-250 мкм и подразделяются на 6 основных групп:
  - **декстрановые микроносители поперечно сшитые** (Цитодекс 1), которые благодаря пористой структуре пригодны для выращивания различных клеточных линий, но имеют заряд, равномерно распределенный по всему объему частицы и хорошо сорбируют белки и низкомолекулярные компоненты питательной среды;
  - **декстрановые микроносители**, но с несколько сниженной способностью к сорбции субстрата (Цитодекс 2);
  - **микроносители, покрытые коллагеном или желатином** (Цитодекс 3) – также декстрановые частицы, покрытые денатурированныи коллагеном или перекрестно сшитым желатином;
  - **полистиреновые микроносители** (Биосилон, цитосферес). Не имеют пористой структуры, что предупреждает сорбцию питательной среды;
  - **стеклянные микроносители** (Биогласс). Подобно пластикатовым не имеют пористой структуры ростовой поверхности;
  - **целлюлозные микроносители** (ДЕ-53), имеющие цилиндрическую форму с микрокристаллической целлюлозной матрицей и наиболее часто используемые для выращивания первичных и диплоидных культур, которые имеют тенденцию расти в виде гигантских агрегатов.
- Используемые в настоящее время микроносители на основе микропористого желатина или пористого боросиликатного стекла имеют емкость около 3000 кл/мн.

• *Культивирование клеток и тканей беспозвоночных*

- Интерес к клеточным культурам беспозвоночных связан с разнообразием и оригинальностью роста и метаморфоза. С другой стороны, при рассмотрении способов получения энтомопатогенных препаратов отмечалось, что вирусы могут размножаться только при использовании живых клеток насекомых, в связи с чем для получения вирусных препаратов необходимым условием являлось предварительное разведение насекомых-хозяев. Использование клеточных культур беспозвоночных позволяет решить эту проблему.