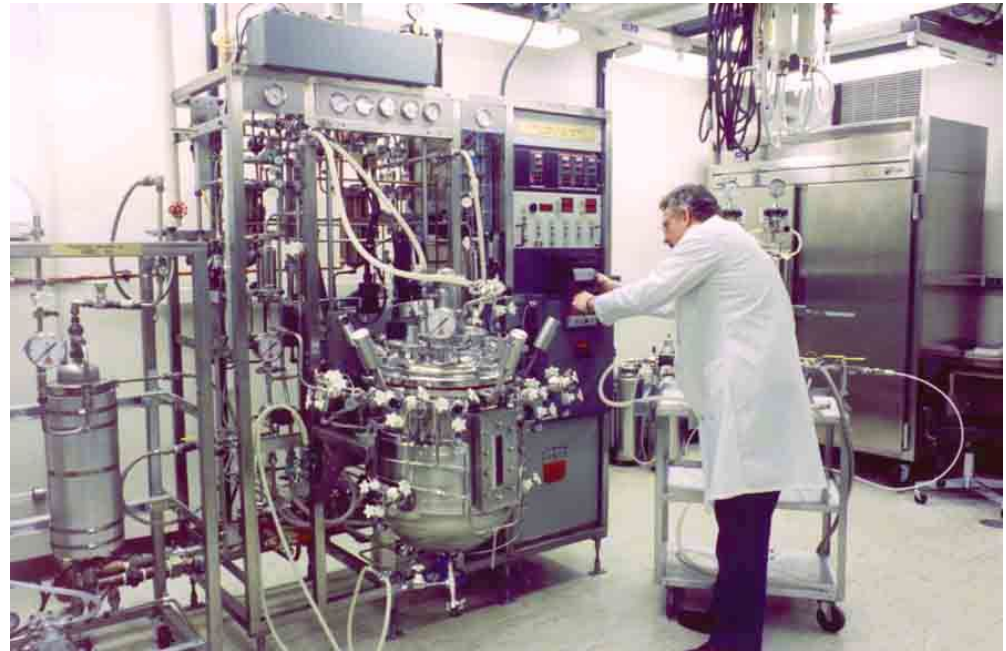


**Для чего  
культивируют  
животные клетки?**

# 1. Получение биологически активных веществ:

- интерферон;
- противовирусные вакцины;
- антитела;
- гормоны;
- факторы роста;
- рекомбинантные белки  
(состоят из аминокислотных последовательностей различных природных белков)



**Большинство получаемых продуктов являются белками**

**Все перечисленные продукты можно получать с помощью микроорганизмов, которые отличаются более высокой продуктивностью и растут на более простых и дешевых средах.**

## **Недостатки использования бактериальных культур:**

- сложности выделения целевого белка из биомассы;**
- существенные потери биологической активности нужного белка.**

## Преимущества культур животных клеток:

1. Клетки способны экскретировать синтезированные белки (потери биологической активности в случае выделения белка из бактерий в 1000 раз выше по сравнению с потерями при выделении белка из среды инкубации с животными клетками).
2. Животные клетки осуществляют посттрансляционную модификацию белка (гликозилирование), что повышает его стабильность и иммуногенные свойства (клетки животных могут обеспечить более качественный конечный продукт)

**Интерферон** - группа белков (гликопротеидов), которые синтезируются клетками позвоночных *in vitro* в ответ на воздействие ряда вирусных или химических агентов (индукторов интерферона).

## Биологические эффекты интерферонов:

- противовирусный;
- антибактериальный;
- противоопухолевый;
- иммуномодулирующий



Отнесен к числу наиболее универсальных и перспективных защитных средств.

# С использованием клеточных культур налажено производство более 35 вакцин для человека и животных

## Вакцины для человека



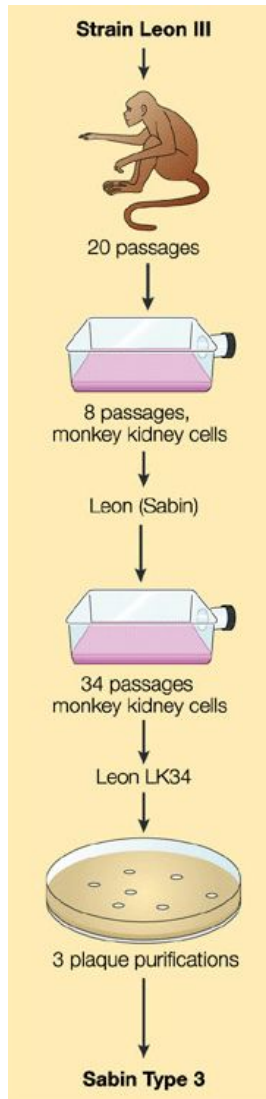
Полиомиелитная  
Коревая  
Антирабическая  
Гриппозная  
Против краснухи и  
паротита

## Вакцины для животных



Ящурная  
Против чумы,  
бешенства,  
лихорадки и др.  
Против болезней  
Марека, Ньюкасла

# Получение вирусной вакцины Солка (против полиомиелита) из тканевой культуры почек обезьян



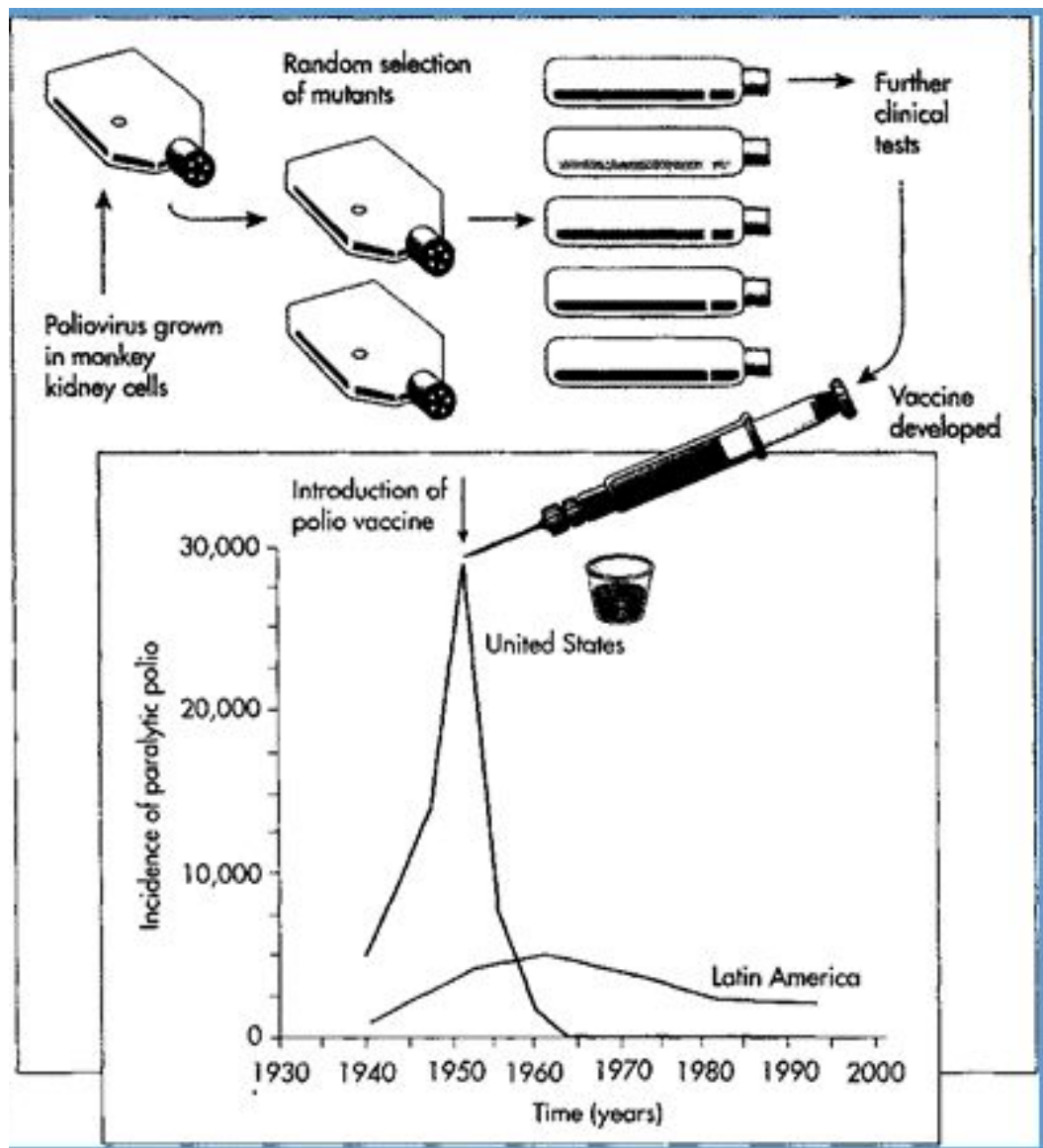
1. Ткань коркового слоя свежих почек измельчают и суспендируют в питательной среде 199, многократно обрабатывают раствором трипсина, чтобы ферментативно разделить клетки.
2. Суспензию центрифугируют и клетки ресуспенсируют в той же среде с добавлением плазмы телячьей крови.
3. Клетки инкубируют в течение 5 суток в особых сосудах для образования монослоя.
4. Производят смену среды, которую засевают вирусом полиомиелита.
5. После 3-х суточного инкубирования клетки полностью разрушаются, и вирусы переходят в раствор. Для сохранения вакцину замораживают.



**Последствия  
полиомиелита**

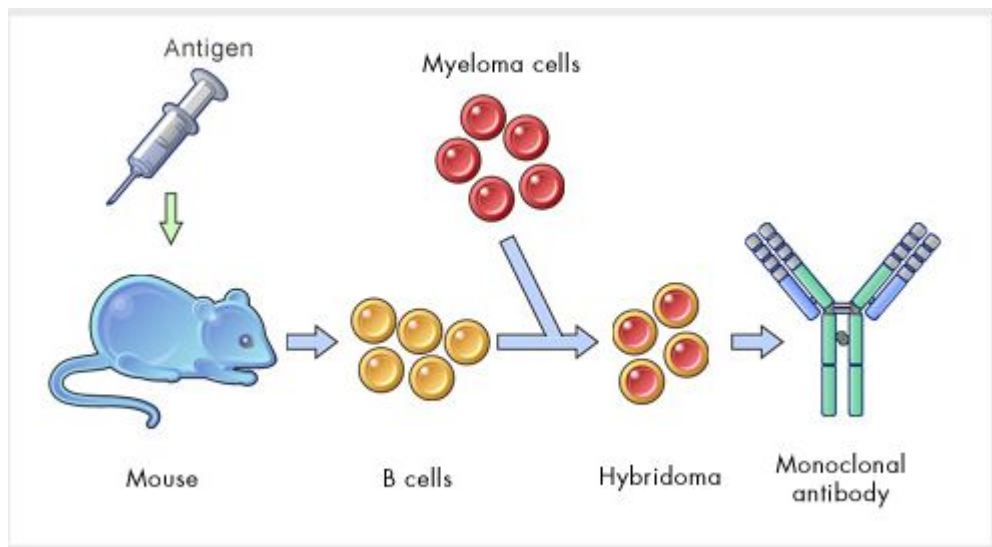


**Вакцинация против  
полиомиелита**



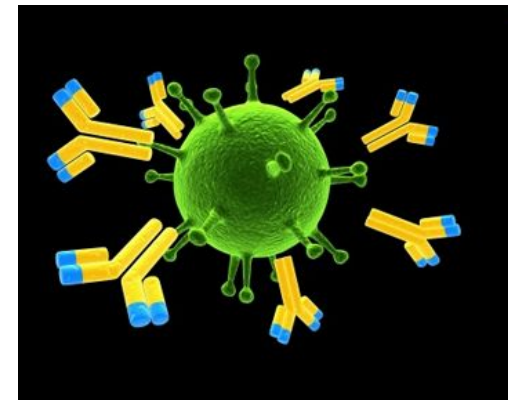
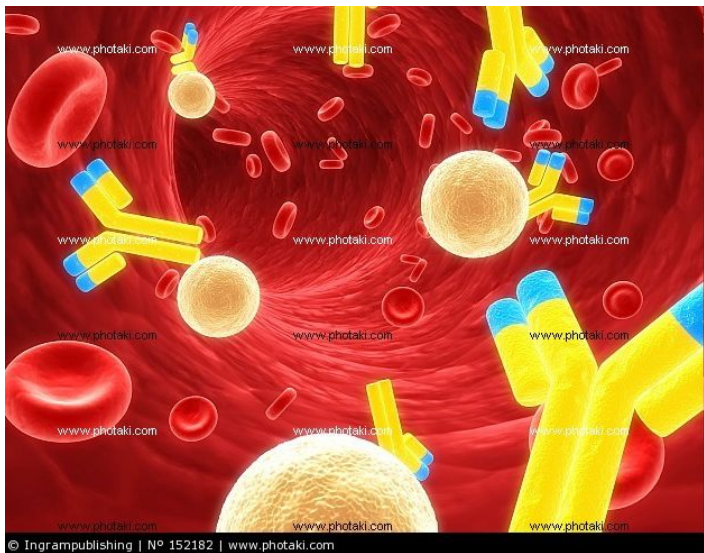


# Получение моноклональных антител



**Антитела** - белки крови, которые синтезируются в организме как проявление защитной реакции при попадании в него чужеродного агента (антигена).

В качестве антигенов выступают микроорганизмы, вирусы, белки, нуклеиновые кислоты и др.



Антитела (иммуноглобулины) составляют по весу около 20% суммарного белка плазмы.

**Синтезируются  $\beta$ -лимфоцитами.**

**Моноклональные антитела (МКА) - антитела, однородные (идентичные) по структуре и специфичности**

## **Направления использования МКА:**



- **медицинская диагностика** (для исследования локализации опухолей, тестирования тканей на гистосовместимость и др.);
- **биохимический анализ** (идентификация различных веществ, процессы очистки различных веществ);
- **лечение злокачественных заболеваний** (доставка противоопухолевых препаратов непосредственно к раковым клеткам);

# **МКА продуцируют гибридные клетки – гибридомы**

**Методика получения гибридом  
была разработана в 1975 году английскими учеными  
Г. Кёлером и Ц. Мильштейном.**

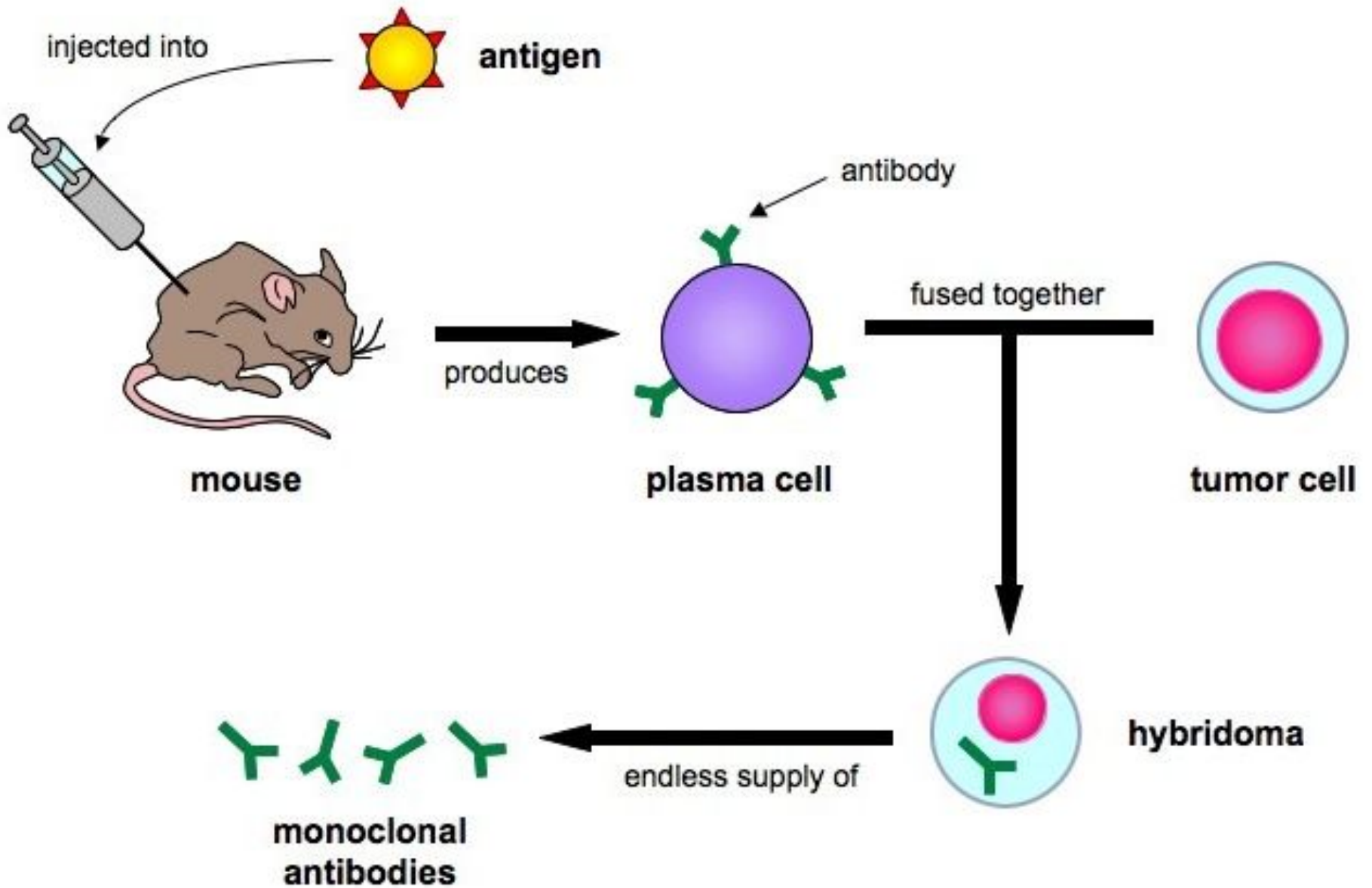
**Гибридомы образуются в результате слияния  
лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных,  
с клетками миеломы костного мозга (опухоль),  
культивируемыми *in vitro*.**

**Лимфоциты + Опухолевые клетки**

**Гибридома**

***Способность  
к синтезу  
антител***

***Способность к  
неограниченному  
размножению***



## 2. Биотестирование

Клеточные линии применяют для тестирования и изучения механизма действия различных веществ:

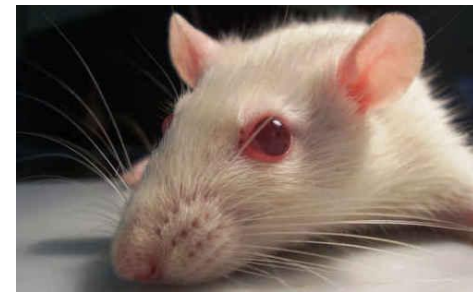
- гормонов,
- лекарственных препаратов,
- детергентов,
- косметических средств,
- инсектицидов,
- консервантов.



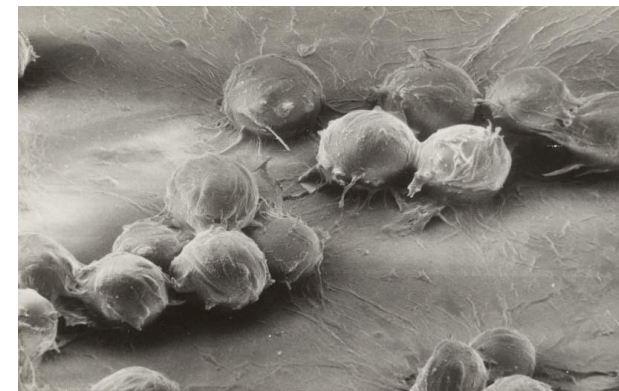
Используются  
в диагностике  
вирусов



## Преимущества культур клеток:



1. Относительная дешевизны и доступность используемого материала, т.к. полученная клеточная линия может использоваться в течение длительного периода в отличие от биомониторинга, при котором гибнут десятки и сотни животных (эксперименты, требующие использования 100 крыс или 100 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стеклах)
2. Возможность быстрого получения результатов и возможность прижизненного наблюдения за моделью в течение всего эксперимента.
3. Высокая корреляция результатов *in vivo* и *in vitro*, т.к. клетки в культуре сохраняют видовую, органную и тканевую специфичность



Фибробласты, выращенные на микроносителях

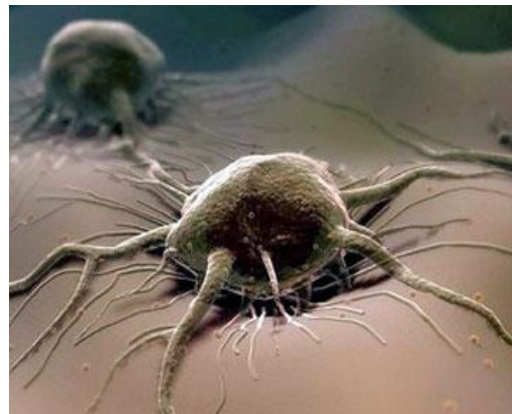


## 3. Использование в медицине

3.1. Исследование механизмов перерождения нормальных клеток в опухолевые

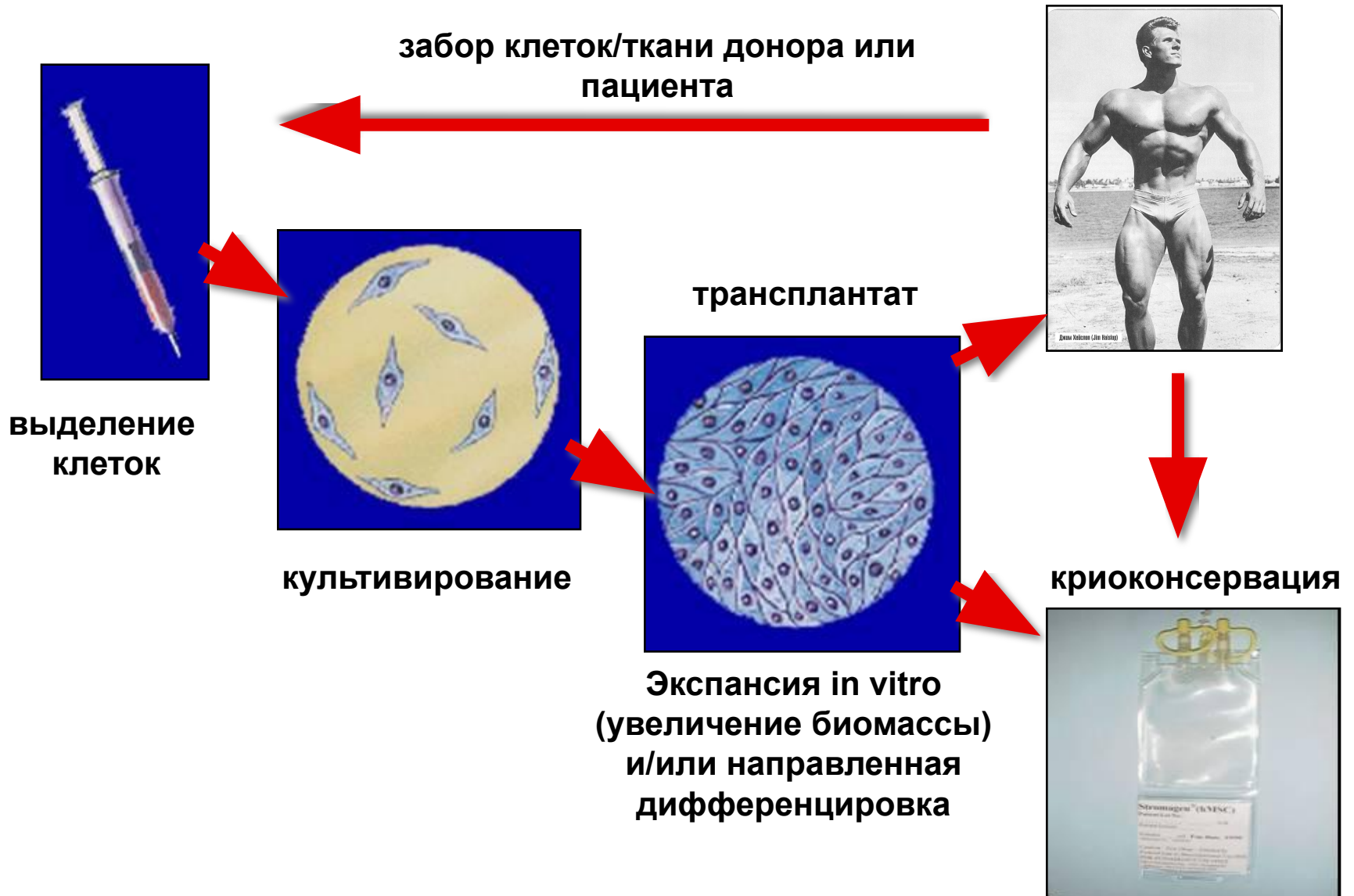
3.2. Изучение тканевой несовместимости и других иммунных реакций

3.3. В онкологии для оценки противоопухолевых средств (культуры опухолевых клеток)



## 3.4. Клеточная терапия

### Типичная схема клеточной терапии



# **Для клеточной терапии применяются стволовые клетки, выделенные из:**

- **красного костного мозга**

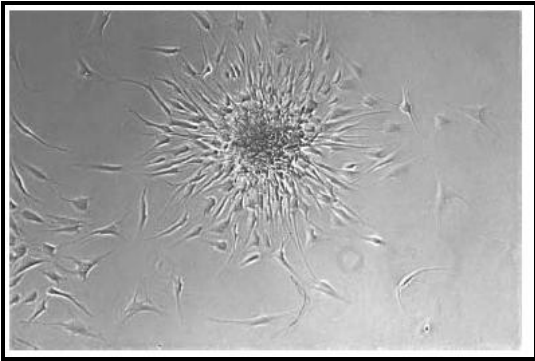
(гемопозитические и мезенхимальные стволовые клетки)

- **пуповинной крови**

- **жировой ткани**

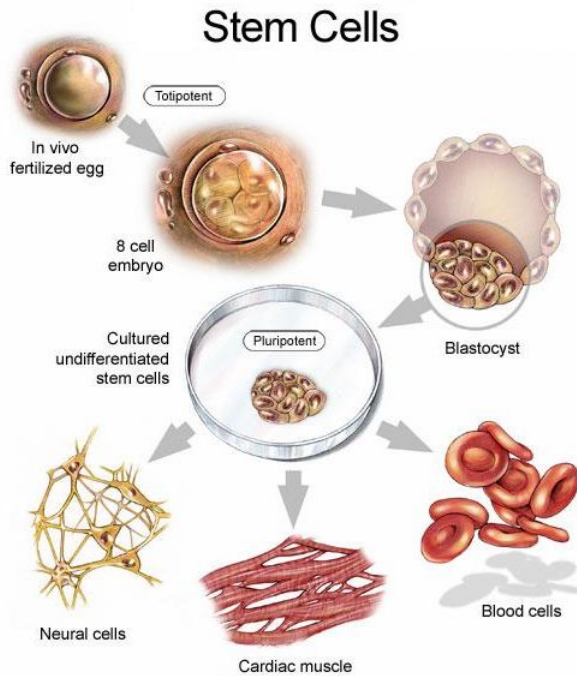
(мезенхимальные стволовые клетки)

- **слизистой оболочки носоглотки**



## СВОЙСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК:

- **самообновление, т.е. способность при делении воспроизводить себе подобные клетки;**
- **потентность, т.е. способность дифференцироваться в один или более типов клеток**



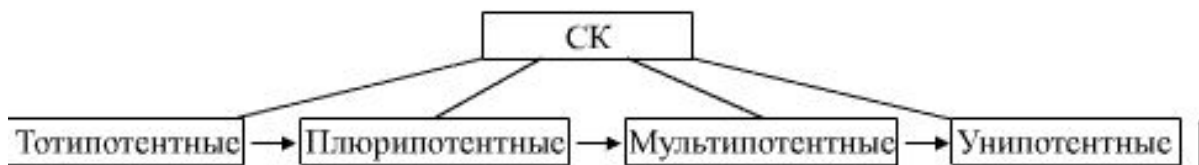
# По способности к дифференциации СК классифицируют:

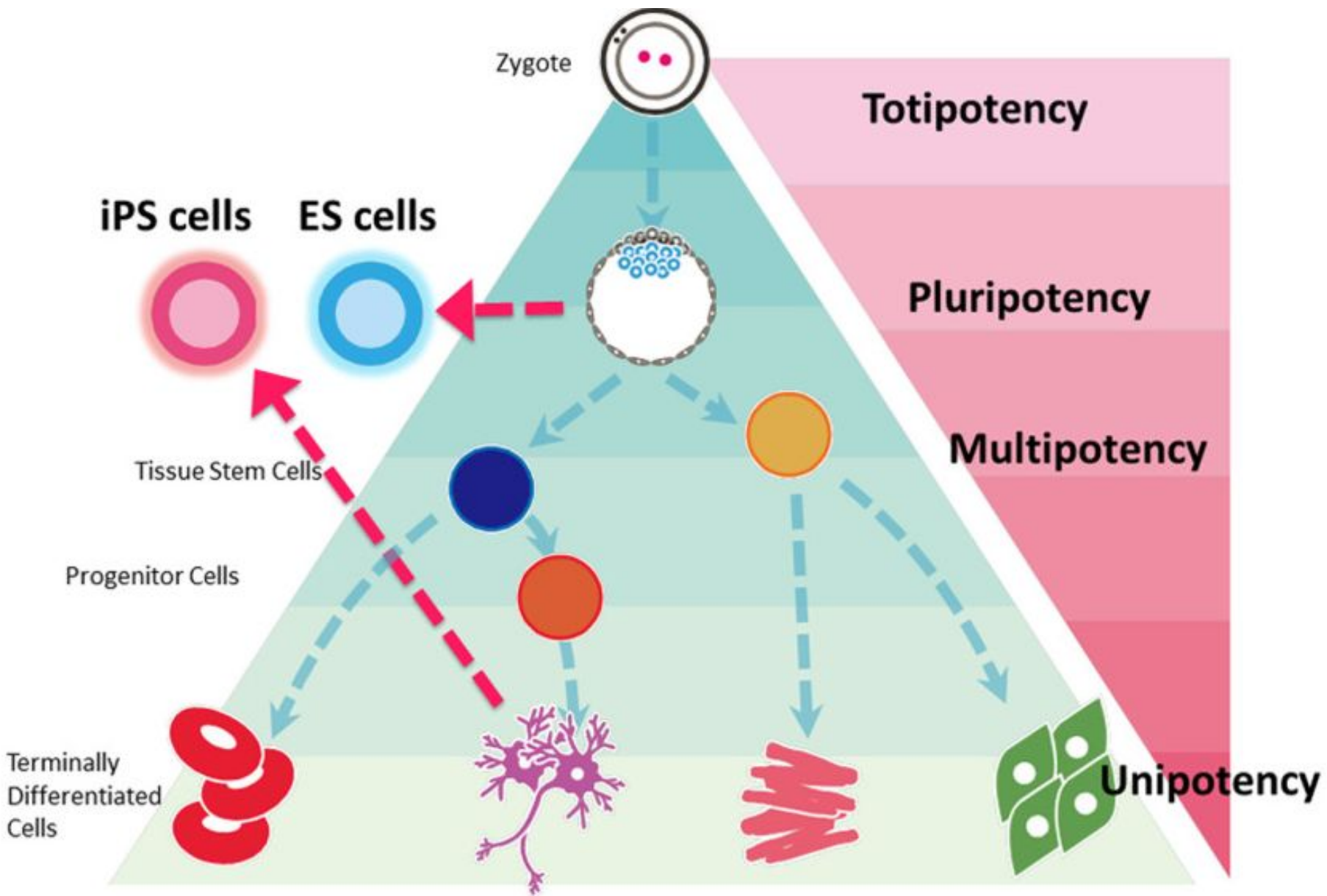
1. **Тотипотентные клетки** - способны формировать все эмбриональные и экстраэмбриональные типы клеток (оплодотворенный ооцит и бластомеры 2-8 клеточной стадии).

2. **Плюрипотентные клетки** – способны формировать все клетки эмбриона.

3. **Мультипотентные клетки** – способны дифференцироваться в несколько типов клеток различных органов.

4. **Унипотентные клетки** - способны образовывать только один тип дифференцированных клеток.





# Успехи практического применения СК уже достигнуты в трёх областях:

## 1) лечению ожогов и заживлении ран

(создание искусственной кожи, выращенной методами тканевой инженерии)

## 2) терапии острого инфаркта миокарда

(восстановления тканей сердца за счёт регенерации кардиомиоцитов и образования новых капилляров)

## 3) лечению онкологических больных

(трансплантация стволовых клеток костного мозга позволяет восстановить его кроветворную активность, которая частично утрачивается после применения интенсивной химио- и радиотерапии)

# Перспективы использования стволовых клеток

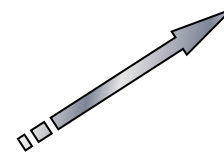
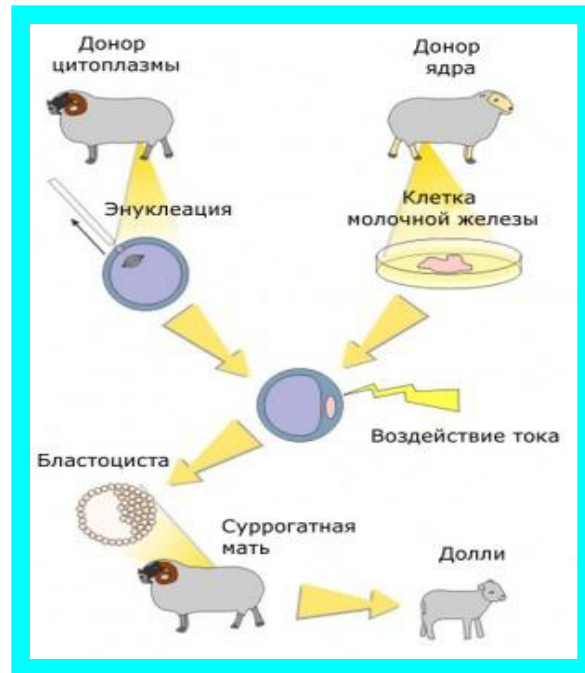
1. Клеточная терапия ряда болезней, в т.ч. наследственных
2. Создание донорского материала для трансплантации (преимущества - абсолютная иммунологическая совместимость и отсутствие необходимости поиска донора)
3. Ревитализация (омоложение)



## 4. Клонирование животных

# Как создать клон?

В основе искусственного клонирования животных лежит технология переноса ядер соматических клеток



# Как создать клон?

- Процесс начинается с оплодотворенной яйцеклетки и соматической клетки, взятых от разных организмов.
- Ядро оплодотворенной яйцеклетки удаляется и заменяется ядром соматической клетки.
- Новая яйцеклетка с ядром соматической клетки развивается в эмбрион, который имплантируется в реципиентную женскую особь (суррогатная мать).
- Из нее развивается организм, идентичный организму, из которого была получена соматическая клетка.

**1996 г.** – разработка эффективного метода клонирования млекопитающих в лаборатории **Яна Вильмута** Рослинского института (Эдинбург, Шотландия)



1-я мать

2-я мать

3-я мать

Долли

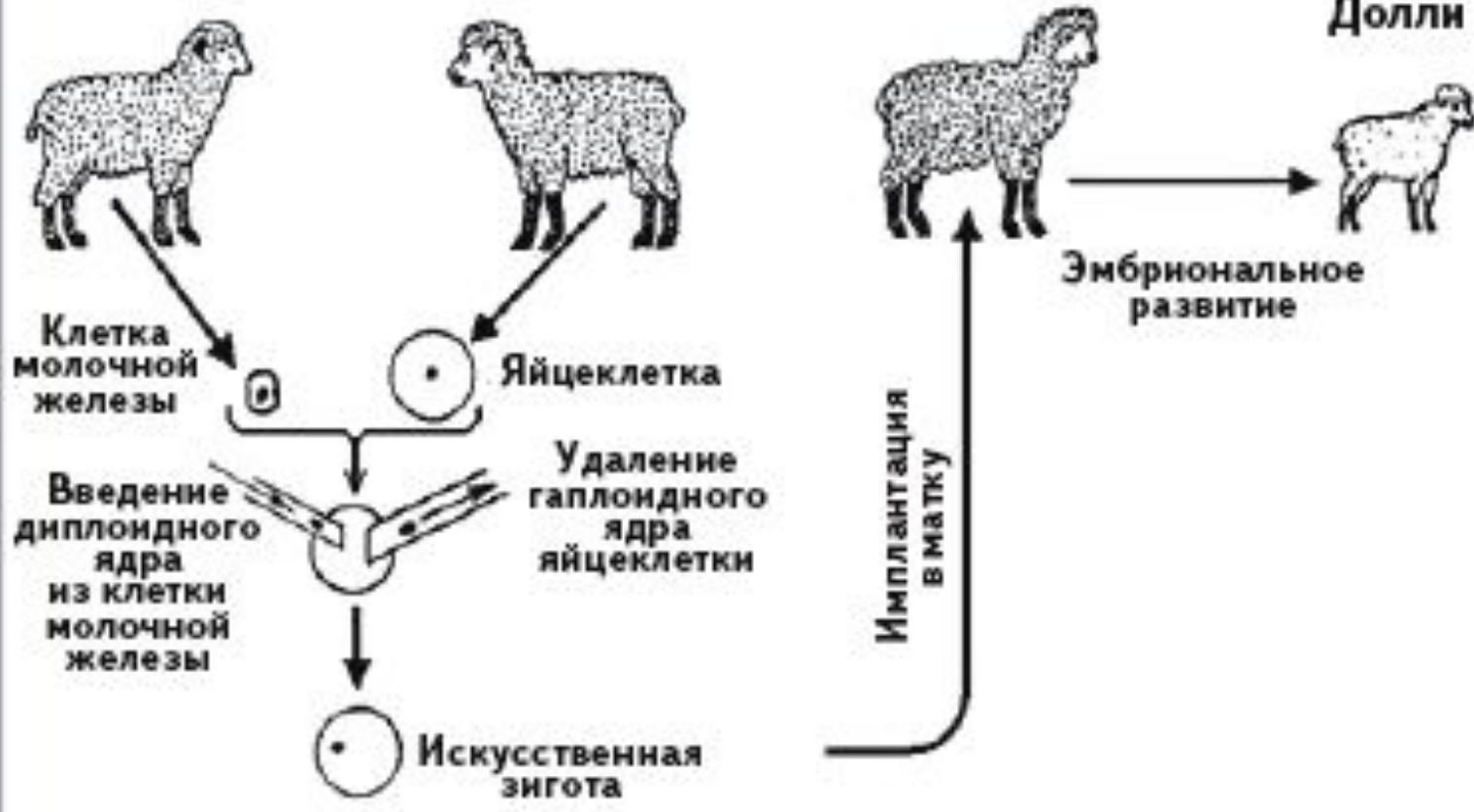
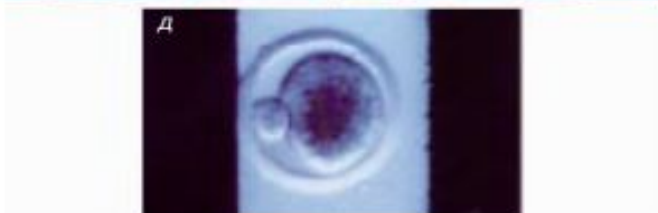
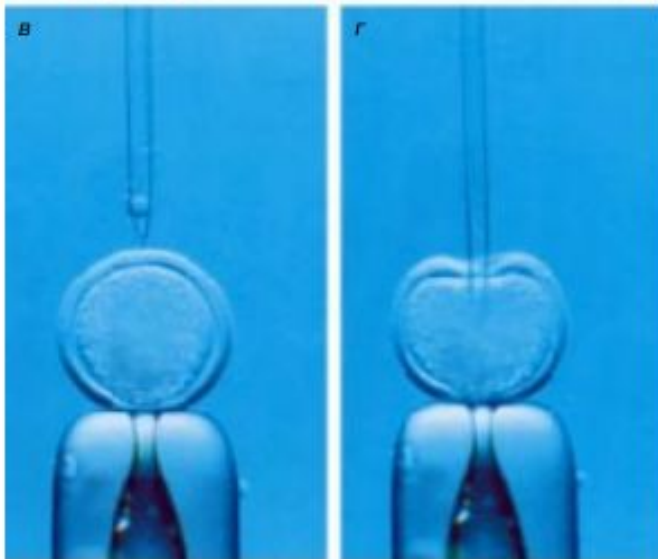
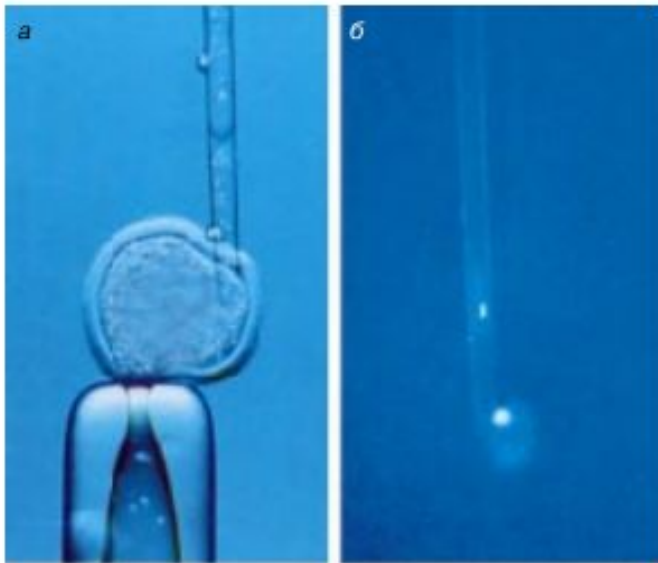


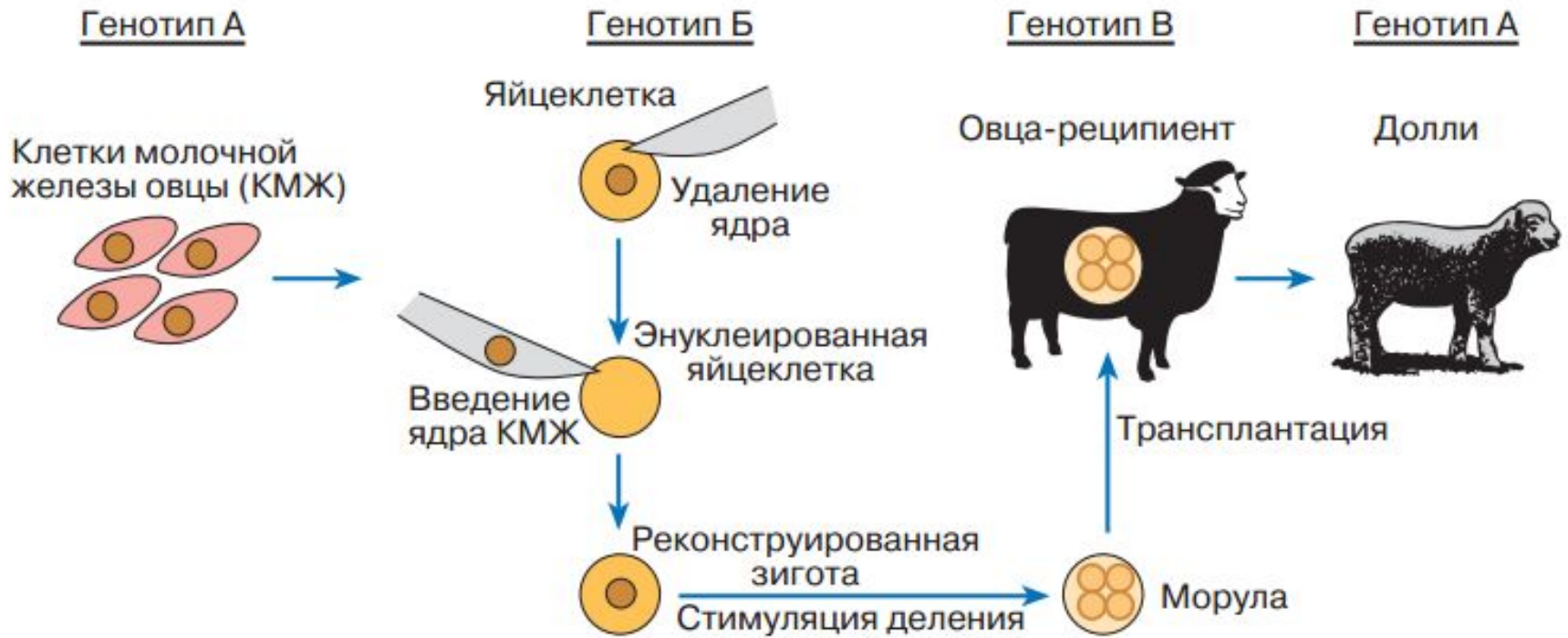
Схема клонирования овцы



## Удаление собственного ядра и слияние энуклеированной яйцеклетки с соматической клеткой

а – удаление ядра из яйцеклетки с помощью тонкой стеклянной микропипетки; б – контроль успеха энуклеации: ДНК удаленного ядра светится в ультрафиолете и, следовательно, ядро удалено из яйцеклетки; в – стеклянная микропипетка с соматической клеткой подводится к яйцеклетке; г – перенос соматической клетки с ее ядром в яйцеклетку; д – электрослияние яйцеклетки и соматической клетки

Из 277 реконструированных эмбрионов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли, содержащая генетический материал взрослой овцы, умершей три года назад.



**Была доказана возможность клонирования теплокровных животных, включая уже вымерших, если от них остался необходимый генетический материал.**

# ЖИЗНЬ И СМЕРТЬ ДОЛЛИ.

Долли родилась 5 декабря 1996 г. в Шотландии. В начале у неё не было даже имени. Ей был присвоен только лабораторный идентификационный номер 6LL3. Имя Долли (англ. Dolly - Куколка) появилось позже, по предложению одного из ветеринаров, помогавших ученым при её рождении. В имени Долли скрыта тонкая ирония. Сама овца получена из клетки вымени. Американская певица Долли Партон любила акцентировать внимание на своем крупном бюсте. В честь неё и назвали Долли.



**Долли жила как самая обычная овца.**

**Родила шестерых ягнят.**

**Её первый ягненок, Бонни, родился в апреле 1998 года. В следующем году родились ягнята Салли и Розы. А затем Долли родила тройню — Люси, Дарси и Коттон.**





**К осени 2001 года у Долли был обнаружен артрит, ей стало трудно ходить. Но заболевание успешно лечили противовоспалительным препаратом.**

**14 февраля 2003 на седьмом году её жизни Долли пришлось усыпить. Причиной послужили прогрессирующее заболевание лёгких и тяжёлый артрит.**

**9 апреля 2003 года чучело Долли было выставлено в Королевском музее Шотландии. А первые клонированные овцы, которым был введён человеческий ген, были названы похожими на неё именами — Полли и Молли.**



# Клонированные животные

1996 — овечка Долли

1997 — первая мышь

1998 — первая корова

1999 — первый козёл

2001 — первая кошка

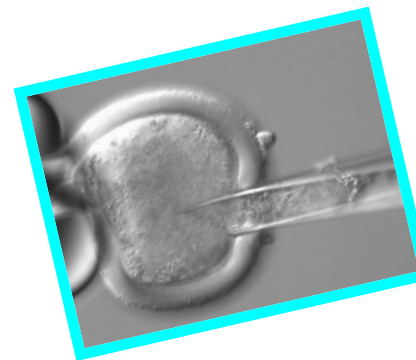
2002 — первый кролик

2003 — первые бык, мул, олень

2004 — первый опыт клонирования с коммерческими целями (кошки)

2005 — первая собака (афганская борзая по кличке Снуппи)

.....



30.03.2014



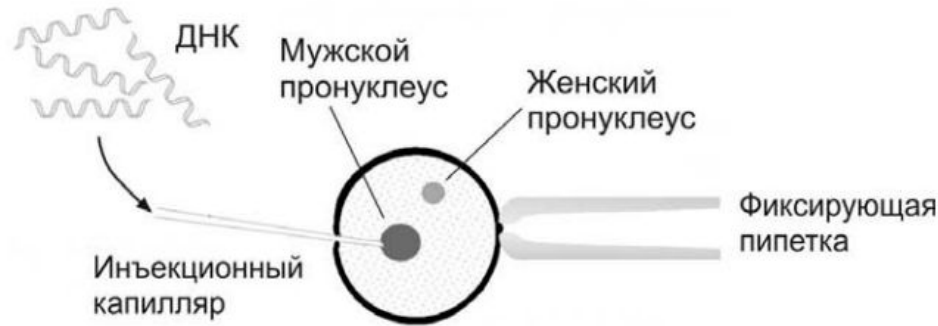
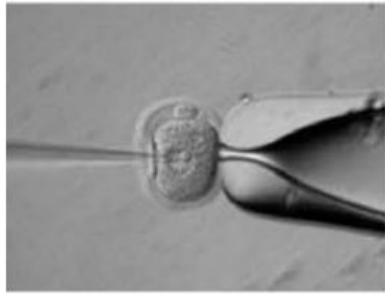
ЦЕНТРАЛЬНОЕ  
ТЕЛЕВИДЕНИЕ

Британка Ребекка Смит, 29-летняя владелица таксы, выиграла конкурс стоимостью в 60 тысяч фунтов, организованного южнокорейской компанией Sooam Biotech, которая создала первый клон таксы по кличке Винни.



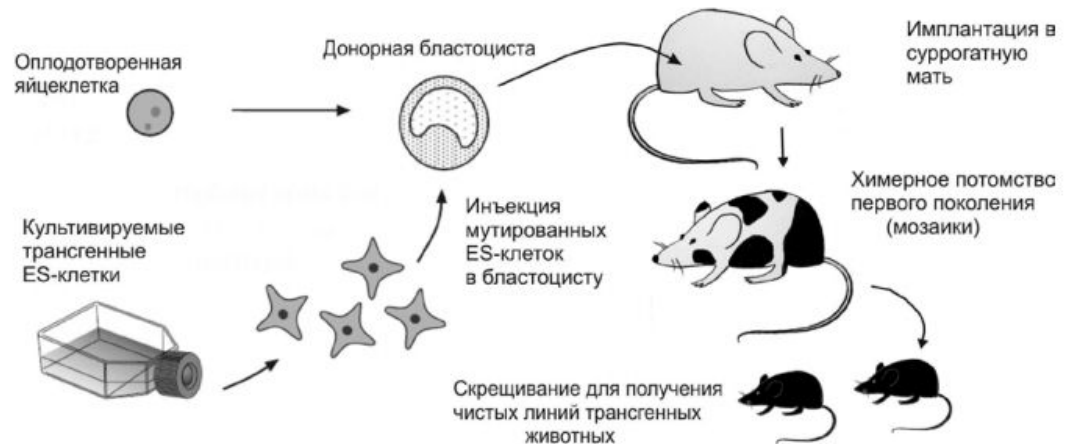
## 5. Получение трансгенных животных

В отличие от растений представляет собой очень сложный и длительный процесс



Микроинъекция экзогенной ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки

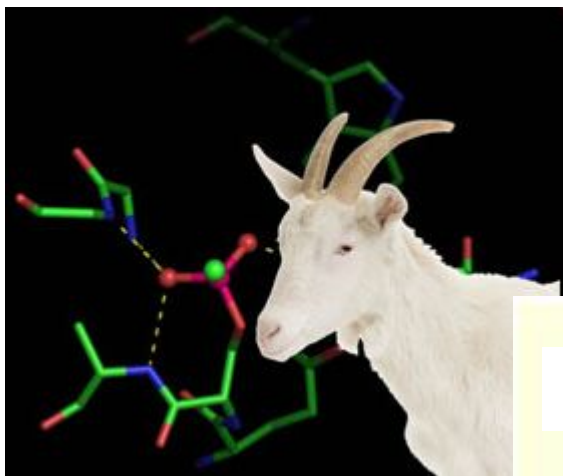
Получение трансгенных мышей методом реконструкции эмбрионов с помощью генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток



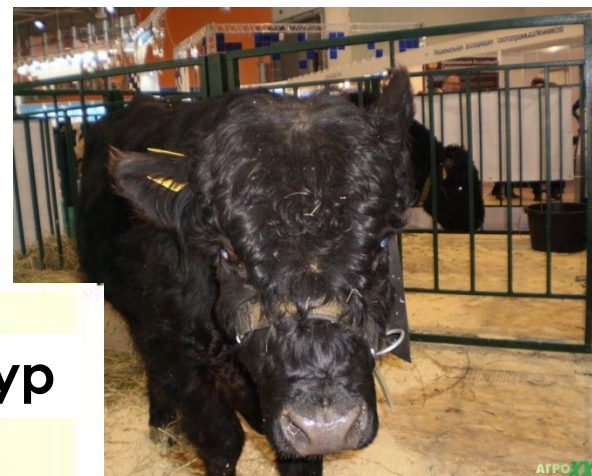
# **Направления создания трансгенных животных**

# 1) Получение фармацевтических белков

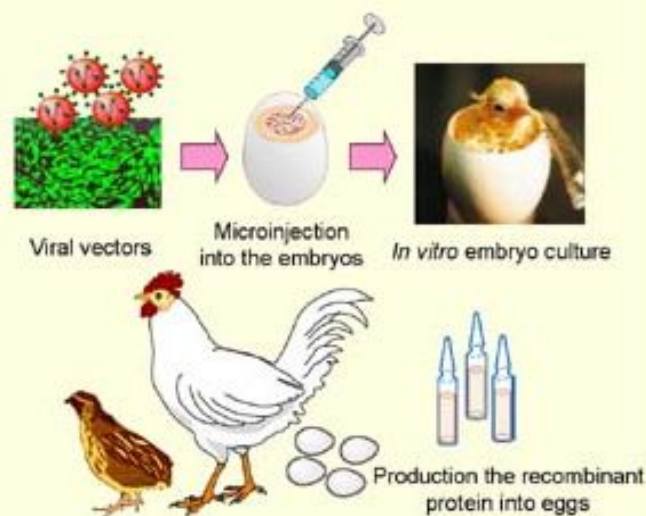
Молоко трансгенных коз,  
коров, овец, свиней



Кровь трансгенных  
бычков



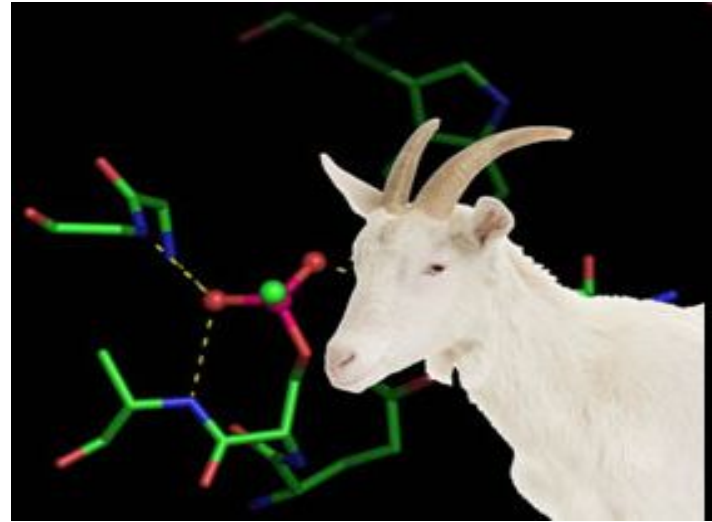
## Яйца трансгенных кур



# Самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы

**«Фарминг» (pharming)** - процесс получения из молока трансгенных домашних животных белков человека или фармацевтических препаратов.

Молоко трансгенных коз, коров, овец, свиней



Первый фармацевтический препарат из молока трансгенных животных (коза) - **антитромбин III**.

В 2006 г. зарегистрирован как лекарство в Европейском союзе.

Проект «БелРосТрансген»: получены трансгенные козы, в молоке которых есть человеческий белок **лактоферрин**.

Этот белок содержится в грудном молоке и обеспечивает младенцам защиту от инфекций.



Лаборатория биохимии и фармакологии биологически активных веществ БГУ – разработана технология выделения лактоферрина из молока трансгенных коз

Получены трансгенные бычки,  
продуцирующие **антитела человека** в  
своей крови для уничтожения раковых  
клеток

Кровь трансгенных бычков



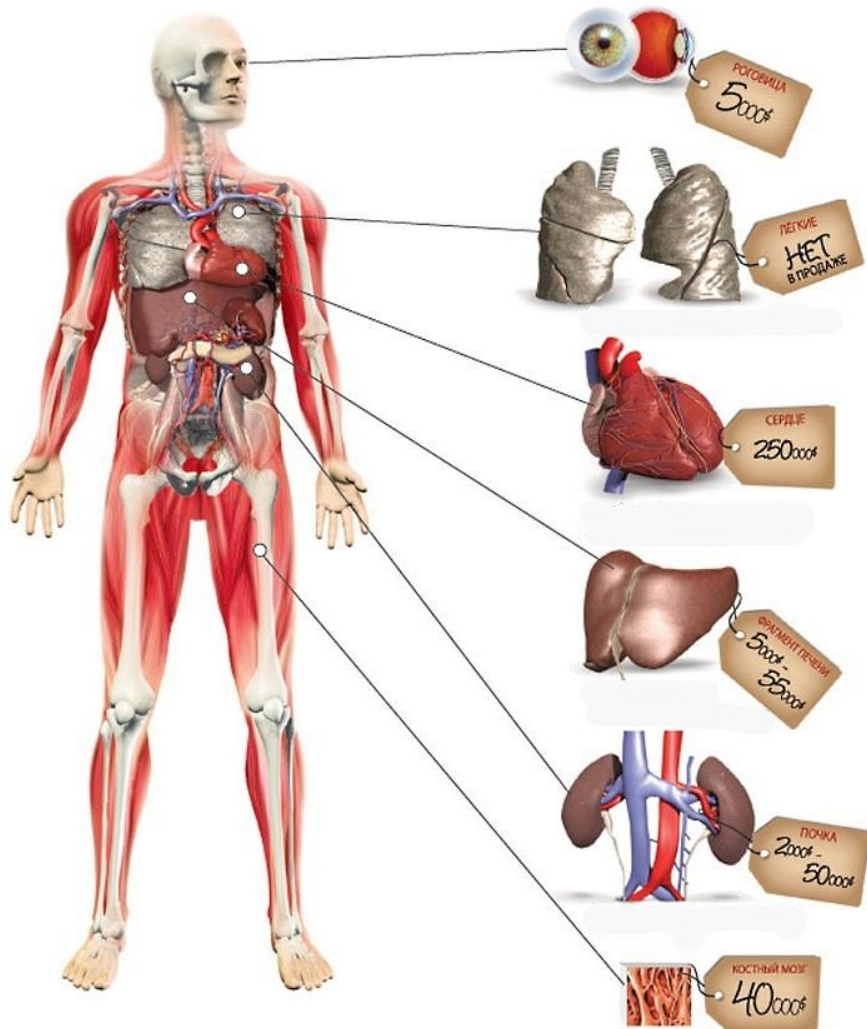


Получены трансгенные куры, которые

- 1) продуцируют **антитела против меланомы** (рака кожи) в яичном белке;
- 2) производят **человеческий интерферон**.



## 2) Источники трансплантатов для человека (пересадка человеку органов животных)



Органы свиньи подходят человеку по своему строению, размеру и многим биохимическим показателям, но такие пересадки невозможны, т.к. эти органы будут немедленно отторгнуты иммунной системой пациента

## **Задачи:**

- 1) преодоление иммунологических барьеров (гистосовместимость);**
- 2) недопущение переноса патогенов от донорного животного к человеку;**
- 3) анатомическая и физиологическая совместимость донорного органа с человеческим.**

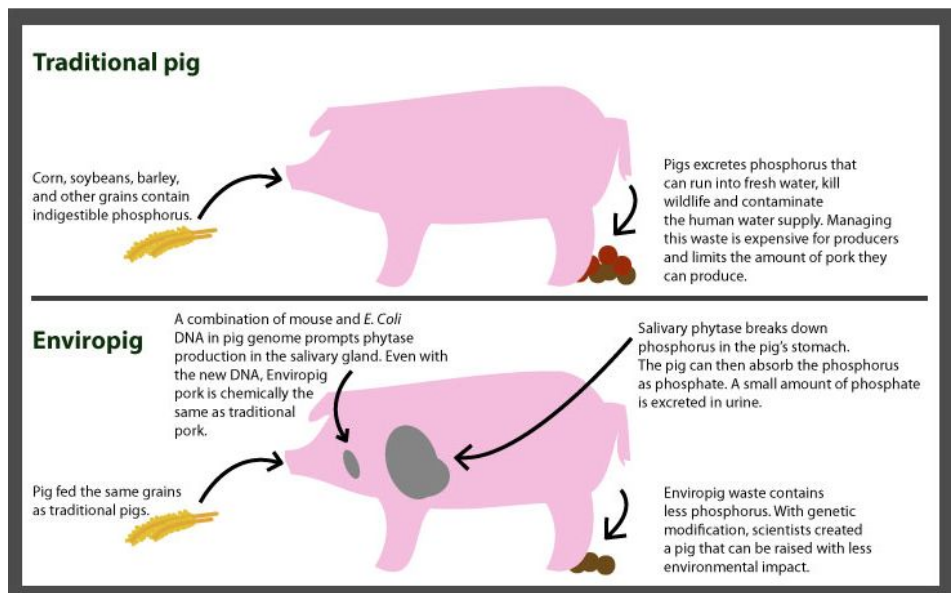
*Первые эксперименты- пересадка свиных транспгенных почек и сердца нечеловекообразным обезьянам (павианы)*

### 3) Трансгенные животные, служащие источником пищи

**В геном свиней удалось встроить несколько ускоряющих рост, которые также оказывают влияние на качество мяса, делая его более постным и нежным**

**Ближе всех на пути к коммерциализации находятся **фитазные трансгенные свиньи** (эко-свиньи, *enviropigs*), целью создания которых было резкое уменьшение навозного загрязнения окружающей среды**

**Созданы животные, продуцирующие молоко для детского питания, по своему составу максимально приближенное к материнскому молоку человека**



## 4) Модельные системы для изучения болезней человека

В настоящее время на мышах смоделированы такие заболевания человека, как СПИД, болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, гипертония, образование опухолей, нейродегенеративные нарушения, дисфункция эндокринной системы, сердечно-сосудистые заболевания и многие другие.



Получена дрозософила с болезнью Паркинсона

## 5) Трансгенные домашние любимцы

### Декоративные рыбки – пример успешной коммерциализации трансгенных ЖИВОТНЫХ



Под торговой маркой GloFish в США продаются (5 дол. / шт.) разноцветные рыбки-зебры *Danio rerio*, окрашенные флуоресцентными белками кораллов.

При соответствующем освещении красные, зеленые и желтые рыбки начинают ярко флуоресцировать, хотя природная окраска *D. rerio* скромного серого цвета

## 6. Создание банков клеточных линий

Криоконсервации клеток, тканей и органов используется для трансплантации, в качестве резервного генофонда редких и исчезающих биологических видов.

С конца XX в. стали возникать банки, в которых хранятся замороженные **стволовые клетки**, используемые для лечения самых различных болезней и травм.



Первый **банк персонального хранения стволовых клеток** пуповинной крови появился в 1992 г. в США.

В настоящее время в мире хранится более 450 000 образцов стволовых клеток пуповинной крови в донорских банках, около 1 млн. в частных банках.

**Банк персонального хранения клеток пуповинной крови** в Республике Беларусь создан и функционирует на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска,



ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

*Вас ожидает радостное событие — рождение ребенка? Сделайте ему бесценный подарок! Сохраните стволовые клетки новорожденного, содержащиеся в пуповинной крови!*

<http://m9gkb.by/hematology-center/stem-cell/>



**Криоконсервация (от греческого криос – мороз) - хранение в замороженном состоянии.**



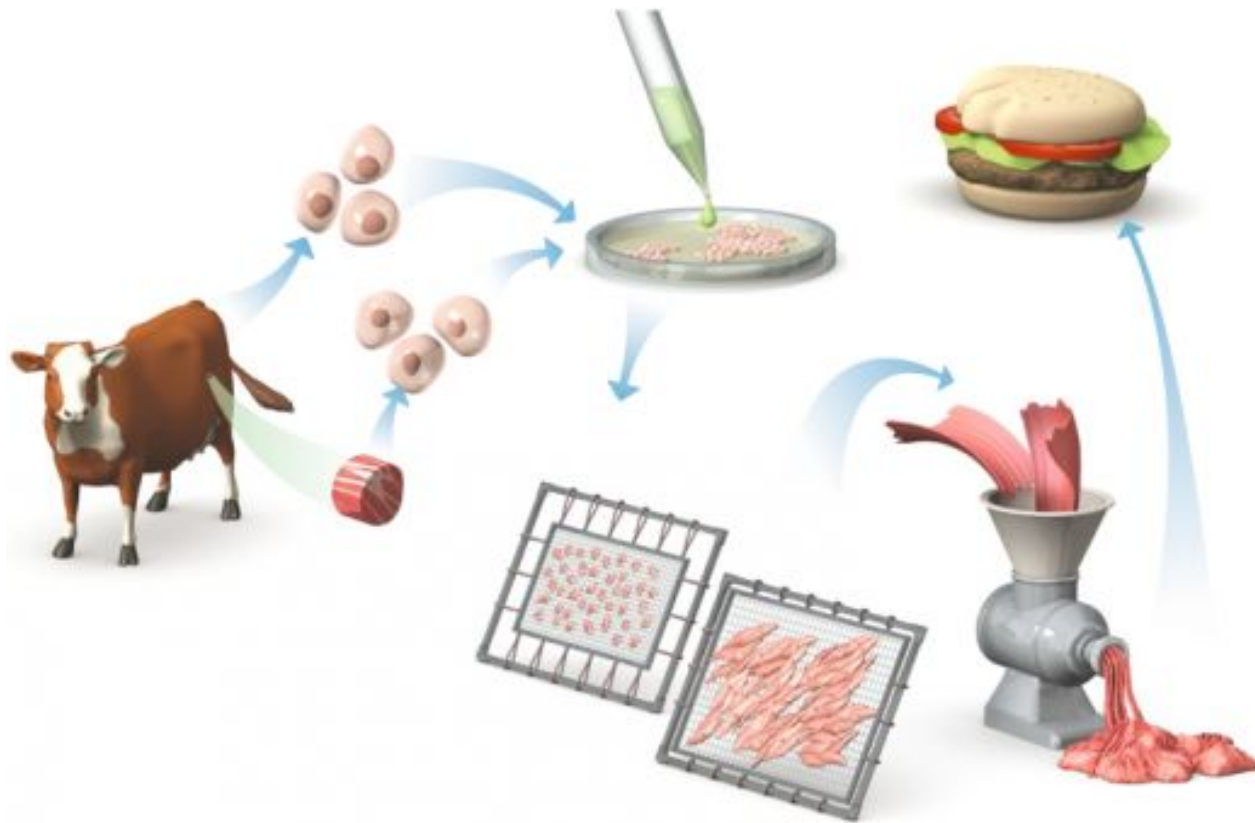
<b>Сухой лед</b>	<b>-79°C</b>
<b>Морозильники с ультранизкой температурой</b>	<b>-80°C</b>
<b>Пары азота</b>	<b>-140°C</b>
<b>Жидкий азот</b>	<b>-196°C</b>

**Криопротекторы** — вещества, защищающие живые объекты от повреждающего действия замораживания

**Причины гибели клеток при замораживании:**

- формирование внутриклеточного льда
- обезвоживание.





*meat, the future!*



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



***Спасибо за внимание!***

