отношение большей части (СВ=х) к меньшей (АС=1-х) будет равняться отношению всего отрезка (АВ=1) к большей части (СВ): СВ/АС=(АС+СВ)/СВ, или х/(1-х)=1/х= 1,61803.. Такое отношение принято называть золотой пропорцией, а соответствующее деление отрезка - золотым делением.

Платон (427...347 гг. до н.э.) приводит определение гармонического деления – одно из древнейших, дошедших до наших дней. «Для соединения двух частей с третьей совершенным образом необходима пропорция, которая бы скрепила их в единое целое. При этом одна часть целого должна относиться к другой, как целое к большей части».

В 1202 г. вышло в свет сочинение "Liber abacci" итальянского купца и математика Леонардо Пизанского (1180-1240 г.г.), известного как Фибоначчи. Решая задачу про кроликов, Фибоначчи получил последовательность чисел, где последующее число равно сумме двух предыдущих чисел: 0; 1; 1; 2; 3; 5; 8; 13; 21; 34, 55 и т.д., эти числа получили название ряда Фибоначчи.

Интерес к золотому сечению сохраняется и в наши дни. Если взять числовой ряд 1,0; 0,62; 0,38; 0,24; 0,15; 0,09 и т.д. (что соответствует шкале мощностей трансформаторов), состоящий из чисел с коэффициентом 1, 618 и аппроксимировать этот ряд чисел, то получим гиперболическую кривую. Этим числовым рядом (Н-распределение) можно описывать в техноценозе при ранжировании соотношение количества видов и численности каждого вида.

В работах А. П. Стахова, Э. М. Сороко, Ю. А. Урманцева, К. Б. Бутусова, М. А. Марутаева, О. Я. Бондара, В. Д. Цветкова, В. В. Очинского, В. И. Коробко на многочисленных примерах из различных областей знаний показано, что свойства и закономерности золотого сечения и чисел Фибоначчи проявляются в виде принципов оптимальности в организации и функционировании систем.

Применение этих закономерностей для поиска оптимальных параметров функционирования служит одним из приемов, исполь-зуемых в качестве медологической основы ценологических исследований электротех-нических систем.

Технологии живых систем

Обеспечение стабильности процессов культивирования штаммов E.COLI – продуцентов рекомбинантных цитокинов

Гончарова О.В., Чугунова Н.М.
ООО «Центр инженерной иммунологии»
п. Любучаны, Чеховский район, Московская обл.

Одним из перспективных направлений, позволяющих быстро и эффективно получать рекомбинантные белки, является бактериальная гетерологическая экспрессия с использованием Escherichia coli. Существуют специальные генно-инженерные и физиологические приемы, позволяющие производить в клетках E. coli многие белки, имеющие фармацевтическое значение, в количестве, достаточном для их клинического применения.

В настоящее время особый интерес вызывает создание иммунобиологических препаратов с использованием рекомбинантных белков, в частности, цитокинов.

В основе качества медицинских иммунобиологических препаратов, полученных с помощью ДНК-рекомбинантной технологии, лежит стабильность и воспроизводимость всех стадий технологического процесса.

харак-тером продукции и технологией производства, включающей процесс культивирования клеток. Биологические процессы характеризуются вариа-бельностью. Длительное культивирование реко-мбинантных штаммов довольно часто приводит к возрастанию гетерогенности популяции за счет сегрегационной и структурной нестабильности плазмид, а также изменения кинетических характеристик роста клеток. Такого рода популяционная неустойчивость сказывается не только на физиологических характеристиках роста продуцента, но и на уровне экспрессии рекомбинантного гена и конечном выходе целевого белка. Снижению генетической и физиологической изменчивости рекомбинантных продуцентов способствуют различные приемы Для предотвращения нежелательного изменения свойств, которое может произойти вследствие многократных пересевов клеток, производство медицинских биологических препаратов должно быть основано, следуя рекомендациям FDA и GMP, на системе основного и рабочего банков клеток. Подобная система хранения предусматривает использование клеток таким образом, что риск их загрязнения или изменения является минимальным.

Изменчивость культуры особенно отчетливо проявляется на стадии биосинтеза целевого белка, поэтому при отработке условий культивирования продуцента необходимо найти оптимальное сочетание параметров, обеспечивающих стабильность процесса в условиях метаболической перегрузки клеток и неустойчивости популяции в целом.

Уровень экспрессии рекомбинантного белка на стадии получения биомассы определяется не только составом питательной среды и условиями культивирования, но и качеством посевного материала продуцента. Выращивание посевного материала – одна из ключевых стадий, влияющая на стабильность дальнейших этапов биотехнологического процесса. Продуктивность посевного материала зависит от многих факторов: генотипа рекомбинантного штамма, состава питательной среды, условий культивирования. Одним из основных критериев посевного материала является его физиологический возраст, который определяет оптимальные сроки передачи инокулята на стадию ферментации. Наиболее качественным посевным материалом следует, очевидно, считать такой, который обеспечивает максимальное проявление генетически детерминированного уровня экспрессии целевого продукта. Никакой универсальной методики получения посевного материала не существует и для каждого продуцента оптимальную схему приходится подбирать заново.

Методика, обеспечивающая получение стабильного посевного материала, наряду с соответствующими приемами консервации и хранения, способствует снижению изменчивости рекомбинантных продуцентов на стадии культивирования.

Целью настоящей работы было - создание банка клеток штаммов–продуцентов рекомбинантных цитокинов и отработка методик получения посевного материала, обеспечивающих стабильное воспроизведение основных характеристик роста продуцентов и уровня экспрессии рекомбинантных белков на стадии получения биомассы.

В работе использовали штаммы E. coli - продуценты рекомбинантных цитокинов: Г-КСФ, α2-интерферона и β-интерферона.

Результаты: Изучено влияние различных условий хранения и количества пассажей культур на стабильность штаммов - продуцентов рекомбинантных цитокинов. Оценена сегрегационная нестабильность плазмиды у всех изученных штаммов при различных условиях культивирования. Полученные результаты позволили подобрать условия хранения и схемы культивирования продуцентов, позволяющие максимально снизить генетическую и физиологическую нестабильность рекомбинантных популяций.

Заложены на хранение основные и рабочие банки клеток рекомбинантных штаммов. При выборе условий хранения (состав среды, содержание криопротектора и температурный режим) руководствовались предварительными результатами проверки генетической и физиологической стабильности трансформированных клеток, хранящихся при различных условиях.

При закладке на хранение и периодически в процессе хранения проводилось контрольное культивирование продуцентов и определялись характеристики роста, уровень экспрессии рекомбинантного белка и рестрикционный анализ плазмиды. Показано, что на стабильность основных параметров штамма при длительном хранении влияют не только условия хранения, но и физиологическое состояние клеток, закладываемых на хранение.

Количество пассажей между банком клеток и ферментацией определялось для каждого продуцента индивидуально, после изучения его физиологических особенностей и закреплялось в нормативной документации.

Достоверно показано, что использование культур из банка клеток, обеспечивает стабильное воспроизведение основных параметров роста и экспрессии рекомбинантных цитокинов в процессе культивирования продуцентов и не приводит к снижению их продуктивности.

Изучены основные этапы культивирования рекомбинантных штаммов. Определены признаки продуцентов, являющиеся существенными при оценке качества посевного материала. Разработаны методики приготовления посевного материала, исключающие пересевы на агаризованных средах, которые обычно снижают уровень рекомбинантной экспрессии. Определены условия выращивания посевного материала, которые позволили стабилизировать его качество по признаку соотношения резистентных и чувствительных к ампициллину клеток (amp R/S). Предложенные схемы культивирования обеспечивают 100% содержание amp R клеток в инокуляте, что способствует снижению гетерогенности популяции на стадии ферментации и обеспечивает стабильное воспроизведение параметров роста штаммов-продуцентов, при сохранении структурной целостности плазмиды и уровня экспрессии рекомбинантных белков. Отработанные методики были успешно апробированы в процессе масштабирования, и используются для наработки стандартного посевного материала для ферментаций в 75-литровом аппарате.