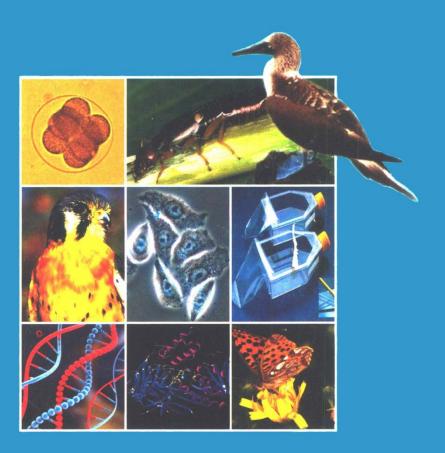
BT-05



वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा



प्राणी जैव प्रौद्योगिकी

BT-05



वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

प्राणी जैव प्रौद्योगिकी

पाठ्यक्रम अभिकल्प समिति

अध्यक्ष

प्रो. नरेश दाधीच

कुलपति

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा(राज.)

•				
स	योजक/	समन्वयक	एव	सदस्य

विषय समन्वयक सदस्य सचिव / समन्वयक

प्रो. एच. सी. जैन (से. नि.)

डॉ. अशोक शर्मा वनस्पति शास्त्र विभाग एसोसियेट प्रोफेसर

राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

वर्धमान महावीर खुला विश्वविदयालय, कोटा

श्री के. सी. सोनी

प्राणीशास्त्र विभाग

लोहिया कॉलेज, चुरू (राज.)

सदस्य

1. प्रो. के. के. शर्मा सदस्य प्रो. एस. डी. प्रोहित सदस्य विभागाध्यक्ष, प्राणीशास्त्र विभाग वनस्पति शास्त्र विभाग

महर्षि दयानन्द सरस्वती विश्वविदयालय अजमेर,(राज.) मोहनलाल सुखड़िया विश्वविद्यालय, उदयपुर (राज.)

2. प्रो. आर. सी. द्बे प्रो. सी. के. ओझा सदस्य सदस्य वनस्पति शास्त्र विभाग निदेशक अकादमिक महातमा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.) गुरुकुल काँगड़ी विश्वविद्यालय, हरिद्वार(उत्तराखण्ड)

3. प्रो. एस. चाँद डॉ. विदया पाटनी सदस्य सदस्य स्कूल ऑफ लाइफ साइन्स वनस्पति शास्त्र विभाग देवी अहिल्या बाई विश्वविद्यालय, इन्दौर(म. प्र.)

राजस्थान विश्वविदयालय, जयपुर(राज.) 4. प्रो. पी.एल. स्वर्णकार सदस्य डॉ. अरविन्द पारीक सदस्य वनस्पति शास्त्र विभाग वनस्पति शास्त्र विभाग महातमा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

संपादन तथा पाठ लेखन

संपादक

प्रो. के. के. शर्मा

विभागाध्यक्ष, प्राणीशास्त्र विभाग म. द. स. विश्वविदयालय अजमेर (राज.)

लेखक

1. प्रो. के. के. शर्मा विभागाध्यक्ष, प्राणीशास्त्र विभाग

म. द. स. विश्वविदयालय अजमेर, (राज.)

राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

2. डॉ. यशोधरा शर्मा प्राणीशास्त्र विभाग अग्रवाल कॉलेज, जयपुर (राज.) डॉ. राजेन्द्र प्रोहित

प्राणीशास्त्र विभाग इँगर कॉलेज, बीकानेर(राज.)

श्री मोहित भारदवाज डॉ. के.एन. मोदी इंस्टीट्यूट ऑफ फार्मेस्य्टिकल्स रिसर्च एण्ड एजुकेशन, गाज़ियाबाद (उ. प्र.)

अकादमिक एवं प्रशासनिक व्यवस्था

प्रो.(डॉ.) नरेश दाधीच प्रो. अनाम जेटली डॉ. पी. के. शर्मा निदेशक निदेशक क्लपति पाठ्य सामग्री उत्पादन एवं वितरण विभाग संकाय विभाग वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय,कोटा (राज.)

पाठ्यक्रम उत्पादन

योगेन्द्र गोयल

सहायक उत्पादन अधिकारी

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा(राज.)

उत्पादन-नवम्बर 2008

इस सामग्री के किसी भी अंश को व.म.ख्.वि. कोटा की लिखित अनुमति के बिना किसी भी रूप में अथवा मिमियोग्राफी(चक्रमद्भण) दवारा या अन्यत्र प्नः प्रस्त्त करने की अनुमित नहीं है।



वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

प्राणी जैव प्रौद्योगिकी

इकाई संख्या व इकाई का नाम	पृष्ठ संख्या
इकाई 1 प्राणी कोशिका की संरचना एवं संगठन। कोशिका अंगक व उनके कार्य। जैव ऊर्जिकी, कोशिका में ऊर्जा संवहन, कोशिकीय झिल्ली परिवहन।	8–35
इकाई 2 इन वीवो व इन विट्रो तंत्र। कोशिका संवर्धन, कोशिका संवर्धन तकनीक के लिए उपकरण व आवश्यक सामग्री। कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला की बनावट।	36–48
इकाई 3 कोशिका संवर्धन की आवश्यकताएँ- संवर्धन वातावरण,अधःस्तर, गैस प्रावस्था, पी.एच. व तापक्रम, कोशिका संवर्धन माध्यम तथा अनुपूरक, संतुलित लवण विलयन। सामान्य एवं वृद्धि संवर्धन माध्यम।	49–60
इकाई 4 कोशिका संवर्धन की तकनीकियाँ। उपकरणों व संवर्धन माध्यम का निर्जमीकरण। निर्जमीकरण यंत्र, ऊतकों का असमुहन एवं प्राथमिक संवर्धन। लेमिनार वायु प्रवाह, प्रकार व अनुप्रयोग।	61–70
इकाई 5 विभेदन तथा अद्यो-विभेदन की संकल्पनाएँ। कोशिका का संवर्धन माध्यम में विभेदन, विभेदन को प्रभावित करने वाले कारक। विभेदन के चिन्हक। वृद्धि गतिकी एवं वृद्धि वक्र।	71–80
इकाई 6 कोशिका संवर्धन का रखरखाव। कोशिका जीवत्ता एवं विषालुता का मापन। उप संवर्धन। प्राणी कोशिका रेखा, उत्पत्ति एवं विशिष्टीकरण	81–93
इकाई 7 ऊतक एवं अंग संवर्धन की तकनीक एवं अनुप्रयोग। ऊतक अभियांत्रिकी के बारे में प्राथमिक जानकारी	94–105
इकाई 8 स्तम्भ कोशिका - परिचय। स्तम्भ कोशिकाओं के प्रकार। स्तम्भ कोशिकाओं की उपस्थिती। स्तम्भ कोशिकाओंका महत्व एवं अनुप्रयोग।	106–117

इकाई 9	
मरम्मतकारी औषधि। प्राणियों में पुनरूद्भवन। पुनरुद्भवन के प्रकार, पुनरुद्भवन व	118–132
प्रत्यारोपन द्वारा, क्षतिग्रस्त ऊतक एवं अंगों की मरम्मत। रेटिनोयड्स द्वारा	110-132
पुनरुद्भवन में प्रेरण।	
इकाई 10	
प्राणियों की क्लोनिंग। क्लोनिंग के प्रकार। भ्रूण-स्थानान्तरण तकनीक। निम्न ताप	133–147
संरक्षण।	
इकाई 11	
क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण। मानव तथा जन्तुओं में अन्तःपात्र निषेचन।	148–157
क्लोनिंग संबन्धित नैतिक मुद्दे व खतरे।	
इकाई 1 2	
पराजीनी प्राणी। प्राणियों में पराजीनी तकनीकी। माइक्रोइंजेक्शन तकनीकी,	158–170
रिट्रोंवायरल वाहक विधि। परजीनी प्राणी की उपादेयता।	
इकाई 13	
औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रौद्योगिकी। मानव इन्सुलिन, इंटरफेरॉन का	171–183
उत्पादन।	
इकाई 14	104 100
वैक्सीन, प्रतिजैविक, प्रतिजन व प्रतिरक्षी तथा एन्जाइम का उत्पादन।	184–192
इकाई 15	
वृहद् मात्रा में प्राणी कोशिका संवर्धन। बायोरिएक्टर। बायोरिएक्टर का स्वनियन्त्रण।	193–200
कोशिका, ऊतक व अंगों की बैंकिंग।	

प्रस्तावना

प्रस्तुत पुस्तक वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा में दूरस्थ शिक्षा के अन्तर्गत संचालित बी.एससी. जैव प्रौद्यौगिकी (द्वितीय वर्ष) के पाठ्यक्रम के आधार पर तैयार की गई है। इस पुस्तक में पाठ्यक्रम को ध्यान में रखते हुये सरल व सुगम रूप में प्राणी जैव प्रौद्यौगिकी को समझाने का प्रयास किया गया है। इस पुस्तक में प्रत्येक इकाई के आरम्भ में प्रस्तावना तथा संक्षिप्त सैद्धान्तिक विवरण दिया गया है जो विद्यार्थियों को विषय के आधारभूत ज्ञात से परिचित करायेगा।

इस पुस्तक में तकनीकी शब्दों को भारत सरकार द्वारा प्रकाशित परिभाषित वैज्ञानिक शब्दावली से लिया गया है। भाषा को और अधिक सुग्राहा बनाने हेतु अंग्रेजी शब्दों को तथा तकनीकी शब्दों को कोष्ठबद्ध करने का प्रयास किया गया है।

प्रत्येक इकाई के अंत में दिये गये अभ्यास प्रश्न विद्यार्थियों के ज्ञान को अधिक सामाजिक व उपयोगी बनाने में सहायता प्रदान करेंगे। यद्यपि इस पुस्तक को यथासंभव सरल व सुगम बनाने का प्रयास किया गया है। तथापि मानवीय भूल से हुई त्रुटियों के लिए लेखक मंडल क्षमाप्रार्थी है। पुस्तक को और अधिक स्तरीय बनाने हेतु विद्यार्थियो तथा शिक्षकों से सुझाव आमंत्रित है।

इकाई- 1

प्राणी कोशिका की संरचना एवं संगठन कोशिका अंगक व उनके कार्य । जैव ऊर्जिकी, कोशिका में ऊर्जा संवहन, कोशिकीय झिल्ली परिवहन ।

STRUCTURE AND ORGANIZATION OF ANIMAL CELL. CELL ORGANELLES AND THEIRE FUNCTION. THE BIOENERGETICS, THE FLOW OF ENERGY IN THE CELL, MEMBRANE TRANSPORTATION

इकाई की रूपरेखा

- 1.0 उद्देश्य
- 1.1 प्रस्तावना
- 1.2 प्राणी कोशिका की संरचना एवं संगठन
- 1.3 कोशिका अंगक एवं उनके कार्य
 - 1.3.1.0 कोशिका झिल्ली
 - 1.3.1.1 कोशिका झिल्ली की भौतिक प्रकृति
 - 1.3.1.2 कोशिका झिल्ली के कार्य
 - 1.3.2.0 माईटोकोन्ड्रिया
 - 1.3.2.1 माईटोकोन्ड्रिया के कार्य
 - 1.3.3.0 पर ऑक्सीसोम
 - 1.3.3.1 परऑक्सीसोम के कार्य
 - 1.3.4.0 लाईसोसोम
 - 1.3.4.1 लाईसोसोम के कार्य
 - 1.3.5.0 अंतः प्रद्रव्यी जालिका
 - 1.3.5.1 चिकनी अंतः प्रदव्यी जालिका
 - 1.3.5.2 ख्रदरी अंतः प्रद्रव्यी जालिका
 - 1.3.6. गॉल्जीकाय
 - 1.3.7 राइबोसोम
 - 1.3.8 तारककाय
 - 1.3.9 पक्ष्माभिका तथा कशाभिका

- 1.3.10 केन्द्रक
- 1.3.11 केन्द्रिका
- 1.4 जैव ऊर्जिकी :- कोशिका में ऊर्जा संवहन
- 1.5 कोशिकीय झिल्ली परिवहन
 - 1.5.1 विसरण
 - 1.5.2 परासरण
 - 1.5.3 सक्रीय परिवहन
- 1.6 सारांश
- 1.7 शब्दावली
- 1.8 सन्दर्भ ग्रन्थ
- 1.9 बोध प्रश्न
- 1.1.0 अभ्यासार्थ प्रश्न

1.0 उद्देश्य:

प्राणी जैव प्राद्यौगिकी में क्लोनिंग, टिश्यू इंजीनियरिंग, जीन थेरेपी, मॉलिक्यूलर फार्मिग सिंहत अपार संभावनाएँ निहित है । इन संभावनाओं के दक्षतापूर्ण दोहन के लिए प्राणी कोशिका का विस्तृत ज्ञान होना आवश्यक है । प्रस्तुत इकाई का उद्देश्य प्राणी कोशिका की मौलिक संरचना, कार्य एवं ऊर्जिकी पर प्रकाश डालना है ।

1.1 प्रस्तावनाः

ल्यूवेनहॉक को प्राणी कोशिका को सर्वप्रथम देखने का श्रेय दिया जाता है । प्राणी कोशिका भी कोशिका सिद्धान्त का पालन करती है ।

कोशिका सिद्धान्त-

- 1. जीव का शरीर एक या कई कोशिकाओं तथा इनसे उत्पन्न रचनाओं का बना होता है।
- 2. कोशिका शरीर की आकारिकी, सरंचनात्मक, क्रियात्मक, कार्यिकीय और आनुवांशिक इकाई होती है।
- 3. नई कोशिकाओं की उत्पत्ति पूर्ववर्ती कोशिकाओं के विभाजन से ही होती है। निम्नलिखित तथ्यों के आधार पर जन्तु कोशिका को पादप कोशिका से भिन्न पहचाना जा सकता है-

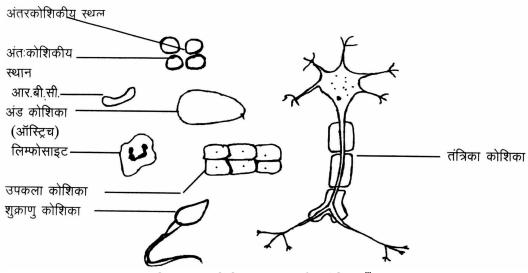
जन्तु कोशिका	पादप कोशिका
कोशिका भित्ति अनुपस्थित	उपस्थित
प्लास्टिड अनुपस्थित, (हिटेरोट्रोफिक)	उपस्थित (ऑटोट्रोफिक)
सेन्ट्रोसोम व सेन्ट्रीओल उपस्थित	अनुपस्थित
गाल्जी काम्पलेक्स पूर्ण विकसित	कम विकसित (डिक्टिओसोम)
कोशिका में धानियां कम / अनुपस्थित	बड़ी व विकसित

1.2 प्राणी कोशिका की संरचना और संगठन:

प्राणी कोशिका चयनात्मक झिल्ली से आस्तिरत इकाई है जिसकी संरचना और संगठन जर्मप्लाज्म में निहित आनुवांशिक सूचना और बाहरी एवं आन्तिरक वातावरणीय कारकों, पृष्ठ तनाव, कार्य इत्यादि पर निर्भर करती है । सामान्यतः कोशिकाएं माइक्रोस्कोपिक आकार (0.01-0.1 mm) की होती है । शुतुरमुर्ग का अण्डा (कोशिका) (17.5 से.मी.) अब तक ज्ञात सबसे बड़ी प्राणी कोशिका है । तन्त्रिका कोशिकाएं सबसे लम्बी कोशिका (1 मीटर) का उदाहरण है । **P P O L** सबसे छोटी (0.1µ) कोशिका है । कोशिका की आकृति आस-पास की कोशिकाओं द्वारा लगाये गये दाब, जीव द्रव्य की विस्कासिता कोशिका झिल्ली की दृढ़ता और आनुवांशिक सूचना पर निर्भर करती है । कोशिकाएँ गोल, लम्बी, चपटी, चौकोर, आयताकार, शाखित, अनियमित इत्यादि विभिन्न प्रकार की होती है । छोटी कोशिकाएँ उपापचय दृष्टि से अधिक सिक्रय होती है । शरीर में कोशिकाओं की संख्या शरीर के आमाप पर निर्भर करती है । 60 किग्रा के व्यक्ति में लगभग 60 X 10¹⁵ कोशिकाएँ होती है जिनमें से 50 प्रतिशत रक्त कोशिकाएं होती है ।

कोशिका	विज्ञान	में	प्रयुक्त	मापक	इकाईयां	-

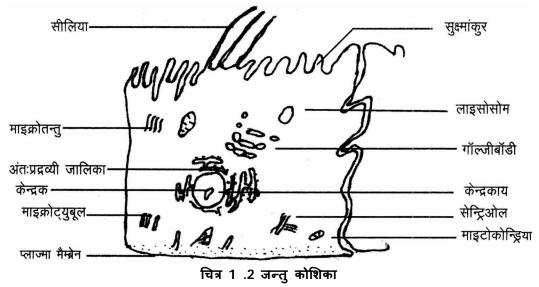
इकाई (Unit)	संकेत	मान (Value)	
1 मीटर	М	1m= 100 cm	
1 सेन्टीमीटर	cm	1cm=0.01m=10 ⁻² m	
1 मिली मीटर Mm		1mm=0.1cm=1000µ=10 ⁻³ m	
1 माइक्रोन	μ	1 μ=10 ⁻⁶ m=1000 nm	
1 नैनोमीटर	nm	1 nm=10 ⁻⁹ m=10 ⁻³ x10 ⁻⁶ m=0.001μ	
1 एंगस्ट्रोम	Å	1 Å=10 ⁻¹⁰ M=10 ⁻¹ X10 ⁻⁹ M=0.1 nm	



चित्र 1. 1 विभिन्न प्रकार की कोशिकाएँ

1.3 कोशिका अंगक और उनके कार्य:

कोशिका अंगक अंतः कोशिकीय स्थान में पाए जाने वाली वे संरचनाएं है जो विशिष्ट कार्य सम्पन्न करती है । कोशिका अंगक शब्द अंग से व्युत्पन्न हुआ है । जिस तरह अंग शरीर के लिए विभिन्न कार्य करते हैं उसी प्रकार कोशिका अंगक, कोशिका के लिए विविध कार्य करते है।



1.3.1.0 कोशिका झिल्ली -

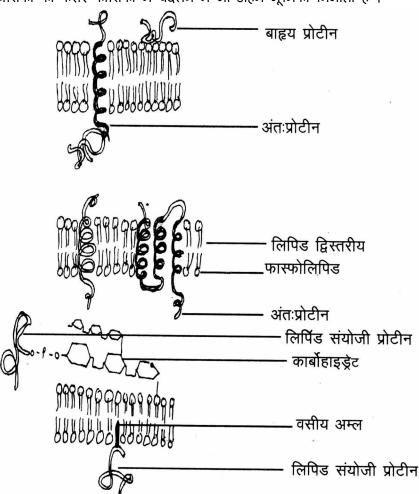
नेगेली ने इसे सर्वप्रथम सैल मैम्ब्रेन कहा तथा जे.क्यू.प्लोव ने प्लाज्मा मैम्ब्रेन नाम दिया। यह कोशिका को बाह्य वातावरण से अलग करती है और एक बंद सरंचना का निर्माण करती है। इसकी संरचना समझने के लिए सिंगर और निकोलसन ने फ्लुइड मोजैक मॉडल दिया जो सर्वाधिक मान्य मत है।

इसके अनुसार प्लाज्मा मैम्ब्रेन में लिपिड मॉलिक्यूल्स दृढ़ता से जमे हुए नहीं होते हैं वरन् ये तरल अवस्था में होते हैं और मैम्ब्रेन में घूर्णन कर सकते है। यही नहीं ये मैम्ब्रेन में इधर-उधर विस्थापित भी हो सकते है।

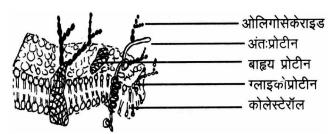
प्रोटीन, लिपिड द्विस्तर में मौजेक अवस्था पाई जाती है। इनमें से कई प्रोटीन तो लिपिड द्विस्तर को पूरी तरह आर-पार भेदन कर देती है। प्रोटीन निम्न प्रकार से व्यवस्थित रह सकती है:-

(अ) **बाहय प्रोटीन** - लिपिड द्विस्तर के दोनों ओर (अंदर एवं बाहर) पाई जाती है । ये प्रोटीन हाइड्रोफिलिक (जल स्नेही) प्रकृति की होती है । ये प्रोटीन लिपिड द्विस्तर के पूर्णत: बाहर होती है और नॉन कोवेलेन्ट बॉन्ड से जुड़ी रहती है । पी.एच. परिवर्तन द्वारा इन्हें मैम्ब्रेन से पृथक भी किया जा सकता है । ये प्लाज्मा मैम्ब्रेन की समस्त प्रोटीन का 20-30 प्रतिशत भाग बनाती है जैसे- स्पेक्ट्रिन, सायटोक्रोम-सी, एसिटिल कोलीन एस्टेरेज इत्यादि ।

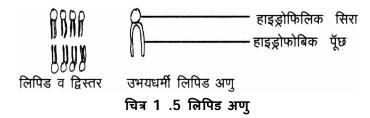
- (ब) अंतः प्रोटीन- यह कुल मैम्ब्रेन प्रोटीन का 70 प्रतिशत भाग बनाते है। ये प्रोटीन मैम्ब्रेन में आशिक / पूरी गहराई तक धंसी रहती है इन्हें मैम्ब्रेन से आसानी से अलग नहीं किया जा सकता है। इनकी प्रकृति एष्फीपैथिक होती है। एष्फीपैथिक अर्थात जल स्नेही और जल विरागी दोनों प्रकार के समूह का पाया जाना। इन प्रोटीनों का विस्तृत अध्ययन करने के लिये इन्हें डिटर्जेन्ट द्वारा प्लाज्मा मैम्ब्रेन से अलग किया जाता है। डिटर्जेन्ट भी एम्फीपैथिक प्रकृति के होते है। ये प्रोटीन लिगेंड रिसेप्टर या रास्ते की तरह कार्य कर सकती है। जैसे- ग्लायकोफोरिन A, सायटोक्रोम b-5 इत्यादि।
- (स) **लिपिड संयोजित प्रोटीन** ऐसी प्रोटीन लिपिड बाईलेयर (द्विस्तर) के अंदर धंसी नहीं होती वरन् बाहर की ओर कोवेलेन्ट बंध से बंधित होती है और फॉस्फोलिपिड या फेटीऐसिड / वसा अम्लों से जुड़ी रहती है । जैसे S.R.C, R.A.SI, इत्यादि । S.R.C और R.A.S. प्रोटीन सामान्य कोशिका को केंसर कोशिका में बदलने में भी अहम भूमिका निभाती है ।



चित्र 13 प्लाज्मा झिल्ली का प्रोटीन लिपिड-प्रोटीन मॉडल



चित्र 1.4 प्लाज्मा झिल्ली का फ्लुइड मोजैक मॉडल



मैम्बेन लिपिड-

प्लाज्मा मैम्ब्रेन में अनेक प्रकार के लिपिड पाए जाते है । ये एम्फीपैथिक (एम्पीपैथिक : जलस्नेही व जल विरागी दोनों समूह का पाया जाना) प्रकृति के होते है । अधिकांश लिपिड में फास्फेट समूह पाया जाता है अतः इन्हें फास्फोलिपिड कहा जाता है । इसी तरह अधिकांश में ग्लिसरॉल भी पाया जाता है । अतः इन्हें फॉस्फोग्लिसराइड भी कहते है । मैम्ब्रेन ग्लिसराइड, ट्राई नहीं वरन् डाई-ग्लिसराइड होते है ।

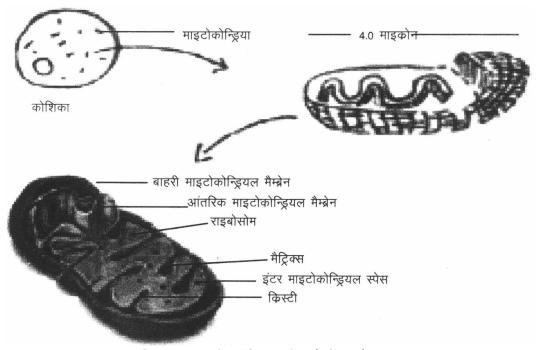
इनके अलावा अपेक्षाकृत कम मात्रा में स्फिंगो लिपिड भी पाए जाते है, लिपिड की एक अन्य किस्म स्टीरॉल (जैसे कॉलेस्ट्रेरॉल) भी पाई जाती है।

प्लाज्मा	मैम्ब्रेन	की	भौतिक	प्रकृति-
----------	-----------	----	-------	----------

मोटापा	60- 130Å
प्रतिरोधकता	10 ² -10 ⁵ ohm/cm
धारिता	0.5-1.3 μ f/cm ²
विश्राम विभव	10-90 mV
अपवर्तनांक	1.6
इन्टरफेशियल तनाव	0.03-3.0 erg / cm ²
जल पारगम्यता	0.25-58 ; 10 ⁻⁴ cm / sec

1.3.1.2 प्लाज्मा मैम्बेन के कार्य -

- (a) प्लाज्मा मैम्ब्रेन कोशिका को निश्चित आकार एवं आकृति प्रदान करती है । एक जीवित तंत्र को बाह्य परिवेश से अलग करने के लिए प्लाज्मा मैम्ब्रेन का होना नितांत आवश्यक है ।
- (b) परिवहन प्लाज्मा मैम्ब्रेन विभिन्न पदार्थो व संकेतों का परिवहन करती है । अनेक जीवों 'में यह श्वसन उत्सर्जन और लोकोमोशन इत्यादि के लिये उत्तरदायी है ।

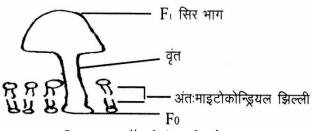


चित्र 1 .6 माईटोकोन्ड्या की आंतरिक संरचना

1.3.2.0 माइटोकोन्ड्या-

कोलिकर ने इन्हें सर्वप्रथम रेखित पेशियों में देखा तथा बैण्डा ने इन्हें माइटोकोन्ड्या नाम दिया । इनका आकार लगभग जीवाण् के बराबर होता है जिससे इन संभावनाओं को बल मिलता है कि इनका उद्भव कोशिका में सहजीवी की तरह रहने वाले जीवाणुओं से हुआ है। प्रोकेरियोओटस तथा आर.बी.सी में माइटोकोन्डिया नहीं पाई जाती है । पेशी कोशिका में इन्हें सार्कोसोम कहते हैं । पूर्ववर्ती माइटोकोन्ड्रिया में विभाजन के दवारा नई माइटोकोन्ड्रिया का निर्माण होता है । इनकी आकृति कोशिका की क्रियात्मक अवस्था पर निर्भर करती है । जैसे- तन्त्मय, कणिकीय मृग्दाकार, आशयी इत्यादि । इनकी लम्बाई सामान्यत: 3.0-4.0µ तथा व्यास 0.5-1.0 u तक होती है ।यह दोहरी इकाई झिल्ली से घिरा होता है । दोनों झिल्लियों के मध्य 60-80 Å का इन्टर माइटोकोन्डिया स्पेस होता है । बाहरी झिल्ली माइटोकोन्डिया का सबसे बाहरी आवरण बनाती है जबिक आन्तरिक झिल्ली वलन व अंर्तवलन दवारा क्रिस्टी का निर्माण करती है माइटोकोन्ड्रिया की बाहरी व आन्तरिक झिल्लीयों की प्रकृति में काफी भिन्नता होती है । बाहरी झिल्ली में जहां 50 प्रतिशत लिपिड संघटन होता है वहीं आन्तरिक माइटोकोन्ड्या झिल्ली में प्रोटीन का प्रतिशत अपेक्षाकृत अधिक होता है । आन्तरिक झिल्ली में फॉरफोलिपिड तथा कॉर्डिओलिपिड प्रच्रता से पाए जाते है । बाहरी झिल्ली अपेक्षाकृत अधिक पारगम्य होती है । जिससे 10,000 डाल्टन तक के मॉलिक्यूल पार हो जाते है । आन्तरिक झिल्ली में अनेक एन्जाइम्स व चैनल प्रोटीन पाई जाती हैं । आंतरिक झिल्ली द्वारा घिरे हुए स्थान को मैट्रिक्स कहते है । मैट्रिक्स में ds DNA (double strand DNA) 70-s राइबोसोम एन्जाइम तथा कैल्शियम फास्फेट के अवशेष के रूप में संग्रहित कैल्शियम पाया जाता है । माइटोकोन्ड्रियल DNA वृताकार होता है और प्रोकेरिआटेस से समानता रखता है । इसमें गुआनिन और साइटोसिन

केन्द्रक के DNA से अधिक होते है । इन माइटोकोन्ड्रियल मैम्ब्रेन में इलेक्ट्रॉन ट्रांसपोर्ट चेन पाई जाती है । इसमें चार प्रकार के इलेक्ट्रॉन केरियर पाए जाते है । (a) फ्लेवोप्रोटीन (b) सायटोक्रोम (c) यूबीक्यूइनोन (d) आयरन-सल्फर प्रोटीन नेगेटिव स्टेनिंग द्वारा अतः माइटोकोन्ड्रियल मैम्ब्रेन की आंतरिक सतह पर गोलाकार सरचना देखी गई जो वृत द्वारा मैम्ब्रेन से जुड़ी रहती है । इनका कुछ भाग मैम्ब्रेन में धंसा रहता है जिसे आधारीय भाग कहते हैं । इन संरचनाओं का गोलाकार शीर्ष उत्प्रेरकीय गुण रखता है जो पाँच भिन्न उप इकाई का बना होता है और एटीपी निर्माण के लिये उत्तरदायी है । इन सरंचनाओं को ऑक्सीसोम कहते है । इसे एटीपी सिन्थेटेज एन्जाइम कहा जाता है ।



चित्र 1. 7 ऑक्सीसोम की संरचना

1.3.2.1 माइटोकोन्ड्या के कार्य-

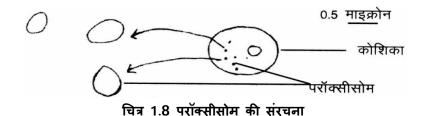
माइटोकोन्ड्रिया कोशिका का शक्तिगृह कहा जाता है । इसकी अंतः माइटोकोन्ड्रियल मैम्ब्रेन एटीपी संश्लेषण के लिए उत्तरदायी है । माईटोकोन्ड्रिया में लिपिड का उपापचय भी होता है । माइटोकोन्ड्रिया झिल्ली के संकुचन व जल स्थैतिक दाब के बढ़ने के कारण एटीपी को एक्टोप्लाज्म में मुक्ता कर देता है । अण्डजनन के दौरान माइटोकोन्ड्रिया पीतक पट्लिका का निर्माण करता है । माइटोकोन्ड्रिया DNA कोशिका द्रव्यी आनुवंशिकता के लिये उत्तरदायी है । क्रेब चक्र भी माइटोकोन्ड्रिया में ही सम्पन्न होता है जिसका वर्णन इसी अध्याय में आगे किया जाएगा ।

1.3.2.0 परॉक्सीसोम-

माइटोकोन्ड्रिया की भाँति पराँक्सीसोम भी ऑक्सीकरणीय उपापचय सम्पन्न करते है । पराँक्सीसोम झिल्ली से परिबद्व सघन कणिकीय कोशिकांग है जिनमें कई ऑक्सीडेटिव एन्जाइम पाए जाते है ।

परॉक्सीसोम में केटेलेज एन्जाइम भी पाया जाता है जो H_2O_2 को H_2O में तोड़ देता है ।

यूरेट ऑक्सीडेज, ग्लायकोलेट ऑक्सीडेज, ऐमीनो ऐसिड ऑक्सीडेज एन्जाइम अनेक सब्सट्रेट को ऑक्सीकृत करके परॉक्सीसोम में परॉक्साइड (H_2O_2) का निर्माण करते हैं । इसी कारण इसे परॉक्सीसोम कहते हैं । H_2O_2 की तरह परॉक्सीसोम भी प्रोटीन का आयात करता है । परॉक्सीसोम का निर्माण अंतःप्रद्रव्यी जालिका दवारा किया जाता है ।

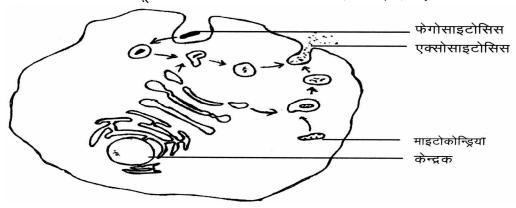


1.3.3.1 परॉक्सीसोम के कार्य -

- * VLCFA (very Long Chain Fatty Acid,> 18 carbon) का ऑक्सीकरण
- * यकृत में कोलेस्ट्रोल व बाईल एसिड (पित्त) का संश्लेषण
- प्लाज्मालोजन व फॉस्फोलिपिड का संश्लेषण
- * कुछ कीटों में प्रकाश उत्पन्न करने के लिए ल्यूसिफेरेज एन्जाइम (Luciferase enzyme) पाया जाता है जो परॉक्सीसोम में मिलता है ।

1.3.4.0 लाइसोसोम -

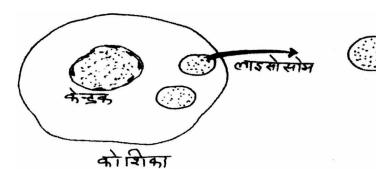
यह कोशिका के पाचक कोशिकांग है । इसमें लगभग 50 प्रकार के एसिड हाइड्रोलेज एन्जाइम पाए जाते है जो लगभग 46 pH (एसिडिक) पर कार्य करते है । एसिड फॉस्फेटेज एन्जाइम की उपस्थित द्वारा लाइसोसोम को पहचाना जा सकता है । लाइसोसोम की झिल्ली में प्रोटोन ट्रान्सपोर्टर ($H^{\dagger}ATpase$) पाया जाता है जो $H^{\dagger}ions$ को लाइसोसोम में पम्प (स्थानान्तरित) करके इसमें अम्लीय माध्यम (pH, 4.6) बनाए रखता है । लाइसोसोम लगभग सभी प्रकार के बायोमॉलिक्यूल को कम आण्विक भार वाले उत्पाद में तोड़ देता है ।



चित्र 1.9 लाइसोसोमल तंत्र

1.3.4.1 लाइसोसोम के कार्य-

बायोमोलिक्यूल्स सेल डेब्रिस, एन्टीजन (Ag) कोशिका, फैगोसोम जीवाणु इत्यादि का
 भक्षण एवं पाचन करना।



चित्र 1.10 कोशिका में लाइसोसोम की स्थिति

सब्स्ट्रेट

लाइसोसोम में पाए जाने वाले विविध एन्जाइम

एन्जाइम

फॉस्फेटेज		
	- w	
*	एसिड फॉरफेटेज	फास्फोमोनोएस्टर
*	एसिड फॉस्फोडाई एस्टरेज	फास्फोडाईएस्टर
न्यूक्लिए	न	
*	एसिड राइबणिक्लऐज	आर.एन. ए
*	एसिड डीऑक्सीराइबोन्यूक्लिऐज	डी.एन.ए
प्रोटीएज		
*	कैथेप्सिन	प्रोटीन
*	कोलेजिनेज	कोलेजन

जी.ए.जी. हाइड्रोलाइजिंग एन्जाइम

*	आइडूरोनेट सल्फेटेज	डरमाटन सल्फेट
*	बीटा गैलक्टोसाइडेज	किरेटन सल्फेट

*	हिपेरिन एन सल्फेटेज	हिपेरिन सल्फेट
*	a-N एसिटिल ग्लूकोज ऐमीनीडेज	हिपेरिन सल्फेट

पॉलीसैकेराइडेजेज एवं ओलीगोसैकेराइडेजेज

*	a-ग्लूकोसाइडेज	ग्लायकोजन
*	फयूकोसाइडे ज	फ्लूकोसिल ओलीगोसैकेराइड
*	a-मैन्नोसाइडेज	मैन्नोसिल ओलिगोसैकेराइड
*	साइलीडेज	साइलिल ओलिगोसैकेराइड

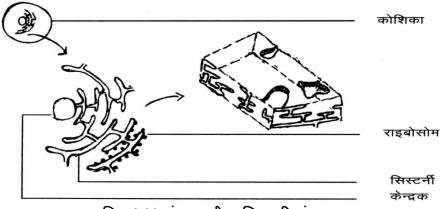
1.3.5.0 अंतः प्रद्रव्यी जालिका

अंतः प्रद्रव्यी जालिका दो प्रकार की होती है-

1.3.5.1 चिकनी अंतः प्रद्रव्यी जालिका (Smooth Endoplasmic Reticulum)

1.3.5.2 ख्रदरी अंतः प्रद्रव्यी जालिका (Rough Endoplasmic Reticulum)

अंतः प्रद्रव्यी जालिका कोशिका में प्लाज्मा मैम्ब्रेन से परिबद्ध स्थान में पाई जाती है । यह केन्द्रकीय झिल्ली से जुड़ी रहती है । प्रोकेरिओट्स अपरिपक्व आर.बी.सी.अण्डों तथा भ्रूणीय कोशिकाओं में यह अनुपस्थित होती है । रेखित पेशी में अंतः प्रद्रव्यी जालिका को सारकोप्लाज्म रेटिक्यूलम कहते है । अंतः प्रद्रव्यी जालिका की मैम्ब्रेन से परिबद्ध स्थान को सिस्टरनल / ल्यूमिनल स्पेस कहते है जबिक परस्पर मैम्ब्रेन के बीच रिक्त स्थान को साइटोसोलिक स्पेस कहते है । खुरदरी अंत प्रद्रव्यी जालिका में अंतः प्रद्रव्यी जालिका की साइटोसोलिक सतह पर राइबोसोम लगे होते हैं । इस तरह खुरदरी अंतः प्रद्रव्यी जालिका को चिकनी अंतः प्रद्रव्यी जालिका से किया जा सकता है ।



चित्र 1.11 अंतःप्रद्रव्यी जालिका की संरचना

1.3.5.1 चिकनी अंतः प्रद्रव्यी जालिका -

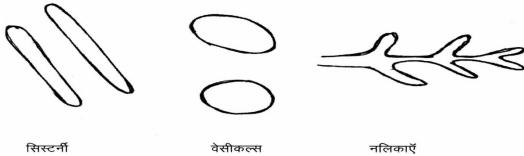
कंकालीय पेशियां स्टीरॉइड उत्पादित करने वाली अंतः स्त्रावी ग्रन्थियों में चिकनी अंतः प्रद्रव्यी जालिका सुविकसित पाई जाती है । विभिन्न प्रकार की कोशिकाओं में कार्य प्रणाली तथा कार्य के अनुसार इनमें भिन्न-भिन्न प्रोटीन पाई जाती है । इस पर राइबोसोम संलग्न नहीं रहते है ।

चिकनी अंत प्रद्रव्यी जालिका के कार्य -

- जननांग व एड्रीनल ग्रन्धि में स्टीरॉईड हार्मीन का संश्लेषण
- * SER में ऑक्सीजन स्थानान्तरित करने वाला एन्जाइम ऑक्सीजिनेज पाया जाता है जो विविध कार्बनिक यौगिकों का ऑक्सीकरण करता है ।
- * ग्लाइकोजन के कण चिकनी अंत: प्रद्रव्यी जालिका की प्लाज्मा मैम्ब्रेन से लगे हुए रहते हैं चिकनी

अंत: प्रद्रव्यी जातिका में ग्लूकोज - 6- फास्फेट एन्जाइम पाया जाता है जो ग्लूकोज - 6- फास्फेट से फास्फेट को हटा देता है । अब यह ग्लूकोज रक्त के जरिए शरीर के ऊतकों तक पहुंचा दिया जाता है । जहां यह ऊर्जा उपलब्ध कराने के काम आता है । जब तक ग्लूकोज

फास्फोराइलेटेड रहता है यह लिवर (यकृत) कोशिकाओं की प्लाज्मा मैम्ब्रेन से बाहर नहीं जा सकता है ।

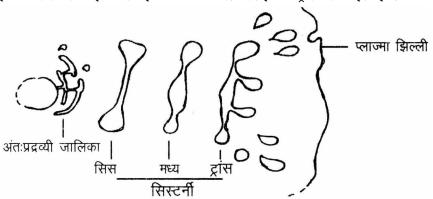


चित्र 1.12 अंतःप्रद्रव्यी जालिका के विभिन्न रूप

1.3.5.2 खुरदरी अंतः प्रद्रव्यी जालिका :- इसकी कोशिकाद्रव्यी सतह पर अनेक राइबोसोम लगे हुए होते है । अतः इसे खुरदरी अंतः प्रद्रव्यी जालिका कहते है । यह सिक्रय रूप से प्रोटीन संश्लेषण करती है जैसे प्लाज्मा मैम्ब्रेन की अंतः प्रोटीन, स्त्रावी प्रोटीन तथा विविध कोशिकाओं (गॉल्जी बॉडी, लाइसोसोम इत्यादि) को निर्यात की जाने वाली प्रोटीन इसके अलावा अंतः प्रद्रव्यी जालिका मैम्ब्रेन व लिपिड का भी संश्लेषण करती है । अंतः प्रद्रव्यी जालिका पर स्थित राइबोसोम में बनने वाली अनेक प्रोटीनों का अंतः प्रद्रव्यी जालिका में ग्लाइकोसायलेशन भी होता है । सिस्टर्नी ट्रांसपोर्ट चैनल की तरह भी व्यवहार करती है ।

1.3.6 गॉल्लीबॉडी-

इस कैमिलिओ गॉल्जी ने सर्वप्रथम देखा यह चपटी डिस्क लाइक, सिस्टर्नी जैसी दिखाई देती है। गॉल्लीबॉडी में धुवीयता पाई जाती है। अंत: प्रद्रव्यी जालिका के सामने वाली गॉल्जी बॉडी सतह को सिसफेस कहा जाता है जबकि विपरित सतह को ट्रांसफेस कहते हैं।



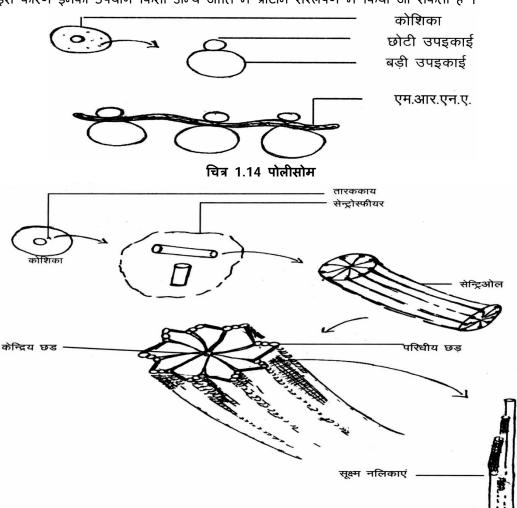
गॉल्लीबॉडी की मैम्ब्रेन अनेक कक्ष भी बनाती है । गॉल्लीबॉडी में प्रोटीन का पश्च अनुलेखन रुपान्तरण भी होता है जैसे एमीनो ऐसिड को हटाना या हाइड्रोक्सीलेशन ग्लाइकोसाइलेशन इत्यादि । गॉल्लीबॉडी में जटिल पोलीसैकेराइड का भी निर्माण होता है । गॉल्जीबॉडी अनेक स्त्रावी वैसिकल का स्त्रवण भी करती है ।

चित्र 1.13 गॉल्जी बॉडी की संरचना

गॉल्लीबॉडी शुक्राणु में एक्रोसोम का निर्माण करती है । अंतः स्त्रावी ग्रन्थियों में हार्मीन का निर्माण करती है तथा अण्डों में पीतक का निर्माण करती है ।

1.3.7 राइबोसोम -

यह जन्तु एवं पादप कोशिका दोनों में पाए जाने वाले सबसे छोटे कोशिकांग है । यूकेरियोट्स में 80 S जबिक प्रोकेरिओटस में 70 S राइबोसोम पाए जाते है । यह अंत प्रद्रव्यी जािलका से संलग्न या बिखरे हुए रहते है । इनमें r-आर.एन.ए.तथा प्रोटीन पाई जाती है । ये प्रोटीन संश्लेषण करते हैं । राइबोसोम के चारों ओर कोई यूनिट मैम्ब्रेन नहीं पाई जाती है । राइबोसोम छोटी व बडी दो उपइकाई से मिलकर बने होते है । अनेक राइबोसोम का बायोजेनेसिस राइबोजेनेसिस कहलाता है । राइबोसोम का निर्माण यूकेरिओट्स कोशिका में केन्द्रिक में होता है । राइबोसोम को प्रोटीन फेक्टरी या सेल इंजिन कहा गया है । राइबोसोम जाित विशिष्ट नहीं होते हैं इस कारण इनका उपयोग किसी अन्य जाित में प्रोटीन संश्लेषण में किया जा सकता है ।



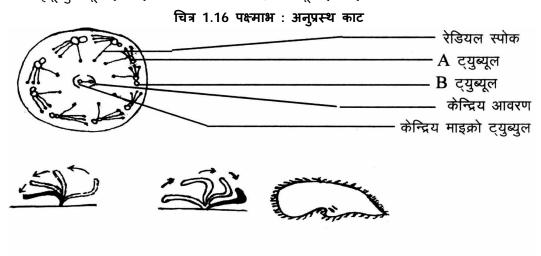
चित्र 1.15 तारककाय की संरचना

1.3.8 तारककाय-

यह केन्द्रक के समीप दो निलका किणकाओं के रूप में पाए जाते है जो एक दूसरे से 90° के कोण पर होती है । इन निलकाकार सरंचनाओं को सेन्ट्रिओल कहते है । अतः इसे डिप्लोसोम भी कहते है । इसके चारों और कोशिकांग रहित स्वच्छ क्षेत्र होता है जिसे सेन्ट्रोस्फीयर कहते है । सेन्ट्रिओल का आकार 2μ x 0.20μ होता है । सेन्ट्रिओल कोशिका विभाजन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं । इनमें तर्कु तन्तु का निर्माण होता है जिनसे क्रोमोसोम जुडते हैं, तर्कु तन्तु गुणसूत्रों के विपरीत धुवों की ओर गमन में सहायक हाते हैं । दृश्य तारककाय शुक्राणु में मुख्य अक्ष का निर्माण करता है । तारककाय पक्ष्माभिका एवं कशाभिका के काइनेटोसोम का भी निर्माण करते है । अण्डाणु में तारकाय अनुपस्थित होते हैं ।

1.3.9 पक्ष्माभिका तथा कशाभिका

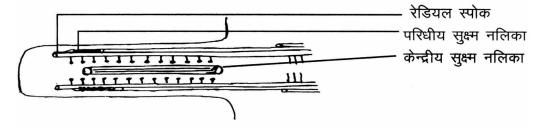
ये रोम सदृश्य साइटोप्लाज्मिक प्रवर्ध है जो एक्टोप्लाज्म से उत्पन्न होते हैं ये संवेदी रचना के रूप में तथा जलधारा उत्पन्न करने के काम आते है । सीलिऐटा समूह में फेफड़े में, सीलिया पक्ष्माभिका को देखा जा सकता है । कशाभिका शुक्राणु, नेफ्रोन की कोशिका इत्यादि में पाई जाती है । इनकी उत्पत्ति आधार काय से होती है ।पक्ष्माभिका तथा कशाभिका को इनके चलन पद्धित से विभेदित किया जा सकता है । पावर स्ट्रोक द्वारा सीलिया (पक्ष्माभिका) दृढ़ता के साथ माध्यम को धक्का देती है । रिकवरी स्ट्रोक द्वारा यह लचीली होकर माध्यम को कम प्रतिरोध देते हुए पुनः अपनी पूर्व स्थिति में आती है । सीलिया तथा फ्लेजिला आधारकाय से जुड़ी रहती है । बेसल बॉडी में भी 9+2 व्यवस्था पाई जाती है । 9+2 व्यवस्था यूकेरियोट्स में बहुत ही सामान्य स्थिति है । आधार काय में 9 परिधीय तन्तु होते है । प्रत्येक तन्तु में A,B व C तीन माइकोट्युब्युल होती है जबिक सीलिया व फ्लेजिला में A व B दो ही माइक्रोट्युब्युल होती है । वि- ट्यूब्युल पूर्ण होती है जबिक B तथा C दोनों अपूर्ण होती है ।



पावर स्ट्रोक रिकवरी स्ट्रोक पक्ष्माभ चित्र 1.1 पक्ष्माभ गमन की विभिन्न स्थितियां

सीलिया और फ्लेजिला की मूलभूत संरचना एक समान होती है किन्तु ये विशिष्ट कार्यों के लिए रूपान्तरित हो जाती हैं।

पक्ष्माभ व कशाभ का एक्सोनीय भाग आधार काय



पक्ष्माभ व कशाभ का एक्सोनीय भाग आधार काय चित्र 1.18 पक्ष्माभ व कशाभ का पार्श्व दृश्य

पक्ष्माभ तथा कशाभ में अन्तर

पक्ष्माभ	पक्ष्माभ
बड़ा	आकार अपेक्षाकृत छोटा
1 से 8 तक होती है	अधिक संख्या में होती है
लय में गति होती है	स्वतंत्र रूप से गति होती है

1.3.10 केन्द्रक -

केन्द्रक का अध्ययन कैरियोलॉजी कहलाता है । यूकेरियोट्स में केन्द्रक, सुस्पष्ट मैम्ब्रेन से घिरा रहता है इसमें केन्द्रक द्रव्य पाया जाता है जिसमें गुणसूत्र पाएं जाते हैं । इस तरह यह आनुवांशिक सूचना का प्राय: प्रत्येक कोशिका में एक केन्द्रक होता है । इनकी आकृति कोशिका की क्रियाशीलता या आंतरिक वातावरण पर निर्भर करती है । केन्द्रक के चारों ओर दोहरी झिल्ली का आवरण पाया जाता है । झिल्ली पर अनेक छिद्र भी पाए जाते है । इस केन्द्रक झिल्ली से राइबोसोम तथा अंत: प्रद्रव्यी जालिका जुड़े रहते है । एक सामान्य मैमेलियन कोशिका की केन्द्रक कला पर लगभग 3000 न्यूक्लियर छिद्र पाए जाते है । न्यूक्लियर मैम्ब्रेन के नीचे न्यूक्लियर लैमिना का तन्त्कीय जाल पाया जाता है जो न्यूक्लियर मैम्ब्रेन सहारा देती है । न्यूक्लियस के अन्दर आर-आर.एन.ए. का निर्माण न्यूक्योल में होता है । न्यूक्लियर मैम्ब्रेन से आर.एन.ए. और प्रोटीन दोनों दिशाओं में आवागमन कर पाते है । मेक्रोमॉलिक्यूल के आवागमन के लिये न्यूक्लियर पोर कोम्पलेक्स होता है । आर-आर.एन.ए. एम-आर.एन.ए., टी-आर.एन.ए. का निर्माण न्युक्लियस के अंदर डी एन ए से होता है । न्युक्लियस के अन्दर सघन कणिका के रूप में केन्द्रिक पाया जाता है । न्यूक्लियस में क्रोमेटिन नेटवर्क होता है जिसमें डी एन ए हिस्टोन प्रोटीन तथा नॉन हिस्टोन प्रोटीन होती है । डी एन ए की आनुवांशिक सूचनाएं सेल के संरचना एवं कार्य का नियंत्रण करती है । यूकेरिओटिक कोशिका मे डी. एन ए क्रोमोसोम के रूप में पाया जाता है ह्यूमन कोशिका में सामान्यतः 6 बिलियन बेस पेयर, 46 ग्णसूत्रों में पाए जाते है । इस तरह कोशिका में लगभग क्ल 2 मीटर लम्बा डी एन ए होता है । इस डी एन ए की पैकेजिंग के लिये न्युक्लिओसोम मॉडल दिया गया है।

न्यूक्लिओसोम कोर कण में डी एन ए में 146 क्षारयुग्म होते हैं । इसमें डी एन ए हिस्टोन ऑक्टोमर के चारों ओर लगभग 2 बार पूरे चक्कर लगाता है । हिस्टोन ऑक्टोमर में 8 हिस्टोन प्रोटीन होती है । $H_2A,H_2A,H_3,H_4,H_4,H_3,H_2$, $H_2B,$ जबिक H1 हिस्टोन प्रोटीन न्यिक्लिओसोम कोर कण से बाहर स्थित होता है । न्यिक्लिओसोम कोर कण संयोजी डी एन ए द्वारा एक दूसरे से जुड़े रहते है ।

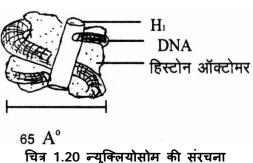
केन्द्रक द्रव्य में प्रोटीन, लिपिड डी एन ए एंजाइम (पॉलीमरेज फॉस्फ्रोराइलेज, एल्डोलेज, ऐसी टाइल को एन्जाइम ए, इनोलेज कोएन्याइम आदि) खिनज (K, Ca, Mg, Na, P)पाए जाते है । इंटरफेज में क्रोमेटिन को अभिरंजित करने पर यह हल्का व गहरा दो तरह से अभिरंजित होता है इस आधार पर इसे यूक्रोमेटिन तथा हेटेरोक्रोमेटिन कहा जाता है।

यूक्रोमेटिन	हेटेरोक्रोमेटिन	
हल्का अभिरंजित	गहरा अभिरंजित	
सक्रिय रूप से अनुलेखन करता है	निष्क्रिय	
H1 हिस्टोन दृढ़ता से बंधित नहीं होता है	दृढ़ बंधन नही है	
(9	— केन्द्रक — केन्द्रिका
(THE STATE OF THE S	– अंतःप्रद्रव्यी जालिका
		राइबोसोम बाह्य केन्द्रक झिल्ली साइटोप्लाज्मिक रिंग

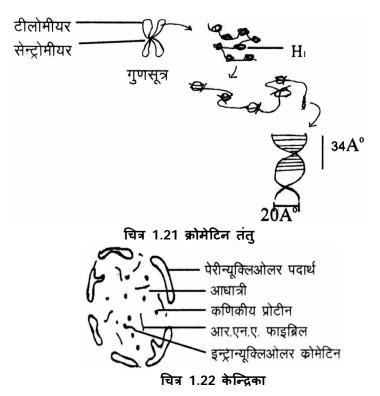
चित्र 1.19 न्यूक्लियर छिद्र कॉम्पलेक्स

1.3.11 केन्द्रिक -

फोन्टोना ने इसकी खोज की थी । इंटरफेज में इसे गोलाकार/अण्डाकार आकृति में देखा जा सकता है । यह गुणसूत्र के न्यूक्लिओलर ऑर्गेनाइजर रीजन / द्वितीयक संकीर्णन से सम्बद्ध है ।



23



न्यूक्लिओलस मे आर एन ए प्रोटीन, कुछ मात्रा में डी एन ए एंजाइम आदि (फॉस्फेटेज, न्यूक्लिओसाइड फास्फोराइलेज, पोलीमरेज) पाए जाते हैं । न्यूक्लिओलस राइबोसोम की उत्पत्ति करता है तथा कोशिका विभाजन को भी नियमित करता है ।

केन्द्रक के कार्य - केन्द्रक में आनुवांशिक सूचनाएं डी एन ए में नाइट्रोजिनस क्षार युग्म के विशिष्ट क्रम में निहित रहती है । डी एन ए कोशिका की आकृति कार्य आर एन ए, राइबोसोम तथा प्रोटीन निर्माण सहित अनेक क्रियाविधियों का नियंत्रण करता है ।

1.4 जैव ऊर्जिकी- कोशिका में ऊर्जा संवहन:

जैव उर्जिकी - कोशिका को विभिन्न कार्यों को सम्पन्न करने के लिए ऊर्जा की आवश्यकता होती है । कुछ जीव, ऊर्जा की आवश्यकता को कम करने के लिये विशेष उपाय अपनाते है जैसे मेंढक में शीत निष्क्रियता, फजांई में बीजाणु निर्माण, पौधों में बीजों का निर्माण आदि । निर्जीव वाइरस के पास ऊर्जा उत्पादन के लिये कोई तंत्र नहीं होता हैं जबिक बेक्टीरिया के पास इस हेतु मीजोसाम तथा यूकेटिओरस के पास माईटोकोन्ड्रिया होती है । वृद्धि मेटोबोलिज्म, रेप्लीकेशन, ट्रांसिक्रिप्शन, ट्रांसिक्रिप्शन, ट्रांसिक्रिप्शन, ट्रांसिक्रिप्शन, ट्रांसिक्रिप्शन इत्यादि अनेक क्रियाओं के लिए कोशिका को ऊर्जा की आवश्यकता होती है । इसके लिए कोशिका के पास ऐसा कोई तंत्र होना आवश्यक है जो किन्हीं ऊर्जा स्त्रोतों से (प्रकाश/ऊष्मा) अथवा पदार्थों से ऊर्जा प्राप्त कर सके । साथ ही इस ऊर्जा को किसी तरह ऐसी अवस्था में संग्रहित किया जा सके । जिससे आवश्यकता पड़ने पर इसे काम में लिया जा सके । (जैसे ATP, NADH+H इत्यादि) । ऊर्जा दो रूपों में पाई जाती है-

(a) गतिकी ऊर्जा $E_k=\frac{1}{2} \ mv^2$

(b) स्थैतिक ऊर्जा Ep=mgh

ऊर्जा की विमा = ML²T⁻²

 $E_k = \frac{1}{2} m v^{2= (M) [L/T]} = ML^2 T^{-2}$

 $Ep = mgh = {^{(M)}[L/T]} {^{2[L]}} {^{=}}ML^{2}T^{-2}$

जैव ऊर्जिकी भी ऊष्मागति के सार्वत्रिक नियमों का पालन करती है । ऊष्मा गतिकी के प्रथम नियम के अनुसार ऊर्जा को न तो नष्ट किया जा सकता है न ही उत्पन्न, किन्तु इसे ऊर्जा के एक रूप से दूसरे रूप में परिवर्तित किया जा सकता है । इस पूरे प्रक्रम के दौरान कुल ऊर्जा संरक्षित रहती है ।

इसी प्रकार कोशिका भी अपने विविध कार्यों को सम्पन्न करने के लिए ऊर्जा उत्पन्न नहीं कर सकती है और न ही कार्यों में प्रयुक्त ऊर्जा को नष्ट करती है लेकिन चूंकि ऊर्जा का एक रूप से दूसरे रूप में स्थानान्तरण संभव है अतः ऊर्जा की किसी अन्य अवस्था से इसका दोहन किया जा सकता है क्योंकि ऐसा होने पर ब्रह्माण्ड की कुल ऊर्जा संरक्षित ही रहेगी।

प्रत्येक तंत्र स्थायित्व पाने के लिए अपनी ऊर्जा कम करना चाहता है । परमाणु भी अपनी ऊर्जा कम करने के लिए बंध बनाते है । जिससे अणु या यौगिक इत्यादि बनते है । वास्तव में बंध के रूप में ऊर्जा संग्रहित रहती है यह ऊर्जा बंधित होने वाले परमाणुओं से स्थानान्तरित होती है अतः उनकी ऊर्जा कम होने से वे भी स्थायित्व महसूस करते है ।

लिपिड, कार्बोहाइड्रेट इत्यादि विभिन्न यौगिकों के इन बंधों को तोड़ने से मुक्त हुई ऊर्जा कोशिका द्वारा काम में ले ली जाती है । ऊर्जा का एक अन्य स्त्रोत प्रकाश ऊर्जा भी है । इसी तरह किसी स्त्रोत से प्राप्त ऊर्जा को रासायनिक बंधों के रूप में भंडारण भी किया जा सकता है ।

जष्मा गतिकी के प्रथम नियम के अनुसार

E=Q+W

D= ऊर्जा

Q= ऊष्मा

W= कार्य

कोशिका को दी गई ऊर्जा E, कोशिका को किसी कार्य को सम्पन्न कराने में प्रयुक्त होती है । इस ऊर्जा का कुछ भाग ऊष्मा के रूप में मुक्त हो जाता है क्योंकि ऊष्मा गतिकी के द्वितीय नियम के अनुसार 100 प्रतिशत दक्षता से कार्य करने वाला इंजन विकसित करना संभव नहीं है अतः समस्त ऊर्जा कार्य सम्पन्न कराने में प्रयुक्त नहीं हो पाती है । द्वितीय नियम के अनुसार ब्रह्माण्ड की एन्ट्रोपी निरन्तर बढ रही है ।

एन्ट्रोपी = S इकाई कैलोरी/डिग्री

एन्ट्रोपी, अव्यवस्था (Random movement/Disorder) का मापक है । जब जैवभार को जलाया जाता है तब यह ऊष्मा को वातावरण मे मुक्त करता है । इस प्रक्रिया से एन्ट्रोपी (Random movement/Disorder) बढ रही है । इसी प्रकार ग्लायकोजेनेसिस में ग्ल्कोज की कई यूनिट जुड़कर ग्लाइकोजन बनाती है । यहां एन्ट्रोपी घट रही है । किसी प्रक्रिया के स्वतः प्रवर्तित होने के लिए आवश्यक है कि ऐसा होने से तंत्र का स्थायित्व बढ़े ऐसे प्रक्रम की डीजी (डेल्टा जी)नेगेटिव होती है ।

$\triangle G = \triangle H - T \triangle S$

गिब्स दवारा दिए इस समीकरण में -

 $\triangle G$ = ऊर्जा से कार्य को सम्पन्न करने के दौरान मुक्त ऊर्जा में हुआ परिवर्तन अर्थात Gp-Gr

 $\triangle H$ = एन्थेल्पी में परिवर्तन = Hp-Hr

T= परम ताप (केलविन) K=°C+273

△S= उक्त प्रक्रम में एन्ट्रोपी में हुआ परिवर्तन = Sp-Sr

P= उत्पाद (Product)

R = अभिकारक (Reactant)

किसी प्रक्रम की डी जी धनात्मक होने पर वह प्रक्रम स्वतः नहीं होगा । किसी अभिक्रिया के साम्य में होने पर डीजी 0 होता है । जैविक तंत्र में डी जी अभिक्रियाएं तो स्वतः हो जाती है । किन्तु ऐसी अभिक्रियाएं सम्पन्न करने के लिए उन्हें किसी ऐसी अभिक्रिया के साथ युग्मित करा दिया जाता है जिसके लिए डी जी इतना ऋणात्मक हो कि दोनों अभिक्रियाओं का कुल परिणाम डी जी ऋणात्मक प्राप्त हो सके । ग्लायकोलाइसिस में ग्लूकोज, -6 फास्फेट में बदलता है । ग्लूकोज का ग्लूकोज-6-फास्फेट में बदलना स्वतः प्रक्रम नहीं है । इसके लिए डी जी + है किन्तु इस चरण को सम्पन्न करने के लिए इस प्रक्रम को एक अन्य अभिक्रिया के साथ युग्मित कर दिया जाता है जिसका डीजी अति ऋणात्मक होता है फलतः ग्लूकोज का ग्लूकोज-6-पी में बदलना अनुकूल क्रिया हो जाती है ।

ग्लूकोज --> ग्लूकोज -6-फास्फेट ; $\triangle G$ =+ ATP --> ADP+P ; $\triangle G$ =-

ग्लूकोज +ATP --> ADP+Pi $\triangle G$ =-

इस तरह ATP जल अपघटन तथा ऐसी ही अन्य अभिक्रियाओं को ऐसी अभिक्रियाओं के साथ युग्मित करके जिनके लिए डी जी + होती है, सम्पन्न कराया जा सकता है | ATP को ADP में बदलना डी जी - प्रक्रम है क्योंकि कोशिका में ATP तथा Pi की तुलना में ATP का सान्द्रता स्तर करीब 10^8 गुना अधिक होता है | इस सान्द्रता प्रवणता के कारण ही यह प्रक्रम स्वतः है |

ऐसी अभिक्रियाएं जिनके लिये pH ऋणात्मक होता है ऊष्माक्षेपी होती है तथा वे जिनके लिये pH धनात्मक होता है वे ऊष्माशोषी होती है ।

A+B ↔ C+D द्रव्य अनुपाती किया के नियम के अनुसार अभिक्रिया की दर अभिक्रियाकारक की सान्द्रता के समानुपाती होती है ।

अग्र अभिक्रिया वेग = K1[A][B]

(Rate of forward Reaction) मोलर अभिक्रिया

अभिक्रिया वेग नियतांक

पश्च अभिक्रिया वेग=K2[C][D]

(Rate of Backward Reaction) साम्य पर,

अग्र अभिक्रिया दर= पश्च अभिक्रिया दर

K1 [A] [B] = K2[C] [D]
$$\frac{K1}{K2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$keq = \frac{K1}{K2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

इस तरह Keq साम्य स्थिरांक से अभिक्रिया की दिशा (अग्र / पश्च) ज्ञात की जा सकती है । इस तरह Keq>1; अग्र अभिक्रिया दर, पश्च अभिक्रिया दर से अधिक होगी । यदि Keq<1; पश्च अभिक्रिया दर, अग्र अभिक्रिया दर से अधिक होगी ।

इस तरह किसी अभिक्रिया का किसी विशेष दिशा में होना अभिकारक व उत्पाद की तुलनात्मक सान्द्रताः पर निर्भर करता है । ATP का जल अपघटन भी इसी सिद्धान्त पर आधारित है । कोशिका में दो प्रकार की उपापचयी क्रियाएं होती है । ऊष्माक्षेपी एवं ऊष्माशोषी **ऊष्माशोषी** - ऐसी अभिक्रियाएं जिनमें ऊर्जा मुक्त होती है । जैसे ग्लायकोलाइसिस क्रेब चक्र

HMP पाथवे

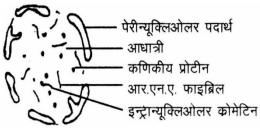
ऊष्माक्षेपी - ऐसी अभिक्रियाऐं जिनमें ऊर्जा का उपभोग होता है । जैसे प्रोटीन संश्लेषण इत्यादि

जन्तु कोशिका में ऊर्जा प्राप्ति प्रकाश से नहीं वरन् प्रोटीन, कार्बोहाइड्रेट एवं लिपिड जैसे मौलिक्यूल्स से होती है । इनके अपघटन से इन्हें सरल / छोटे अणुओं में तोड़ा जाता है । अन्ततः ऊर्जा ऊष्मा के रूप में प्राप्त होती है । ऊर्जा का कुछ भाग ATP, FADH, GTP, NADPH+H+ जैसे अणुओं में भंडारित कर लिया जाता है । जिसे आवश्यकता पड़ने पर विविध स्थानों पर काम में लाया जाता है ।

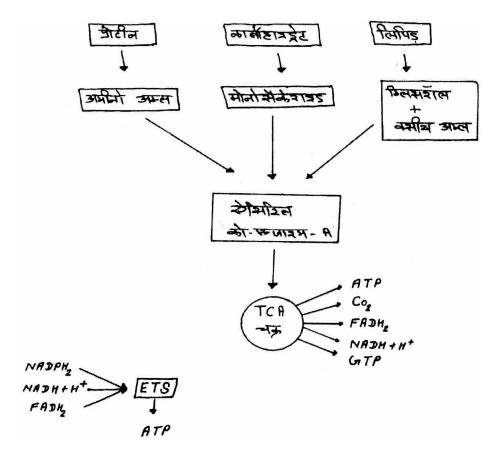
जन्तु कोशिका ग्लाइकोजन को संचित भोजन के रूप में भंडारित करती है । आवश्यकता पड़ने पर ग्लाइकोजिनोलाइसिस द्वारा इसे ग्लूकोज में परिवर्तित कर लिया जाता है । ग्लायकोलाइसिस द्वारा ग्लूकोज को पायरूविक ऐसिड में तोड दिया जाता है ।

ग्लाइकोलाइसिस साइटोप्लाज्म में सम्पन्न होता है इसके लिए ऑक्सीजन की उपस्थिति का होना आवश्यक नहीं है । इसमें 6 कार्बन ग्लूकोज, 3 कार्बन के दो पायरुविक ऐसिड में टूट जाता है । ग्लाइकोलाइसिस में 2 ए टी पी का खर्च होता है तथा कुल उपलब्धि 2 ATP एवं 2 NADPH+H+ का होता है । प्रथम, तृतीय एवं अन्तिम चरण की अभिक्रियाएं ग्लाइकोलाइसिस में उत्क्रमणीय (Reversible) नहीं होती है अतः ये ग्लाइकोलाइसिस का नियमन भी करती है । आक्सीजन ग्लाइकोलाइसिस - यह परिपक्व आर.बी.सी. एवं ल्यूकोसाइट इत्यादि में पाया जाता है। इसमें उत्पन्न NADH पायरुविक ऐसिड को अपचयित करके लेक्टिक ऐसिड बना देता है ।

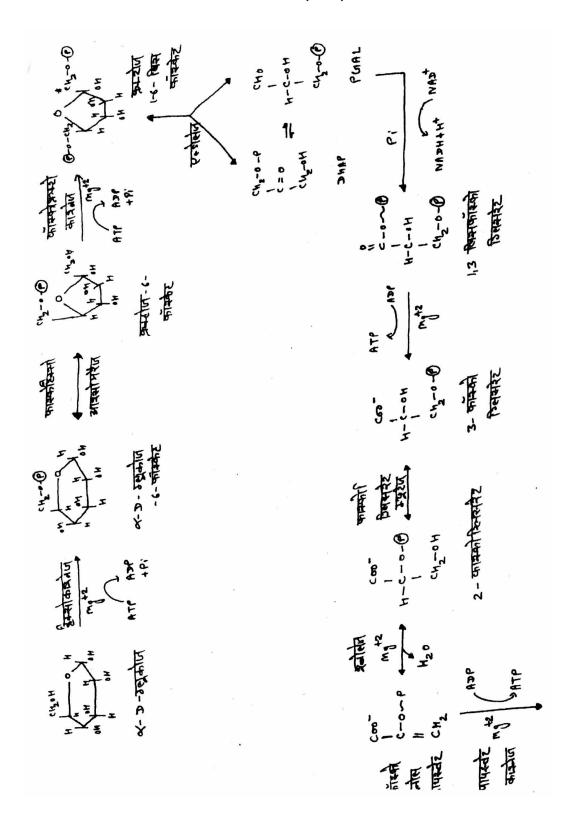
ग्लूकोज + 2 Pi + 2 ADP
$$\longrightarrow$$
 2 लेक्टेट +2ATP +2H₂O



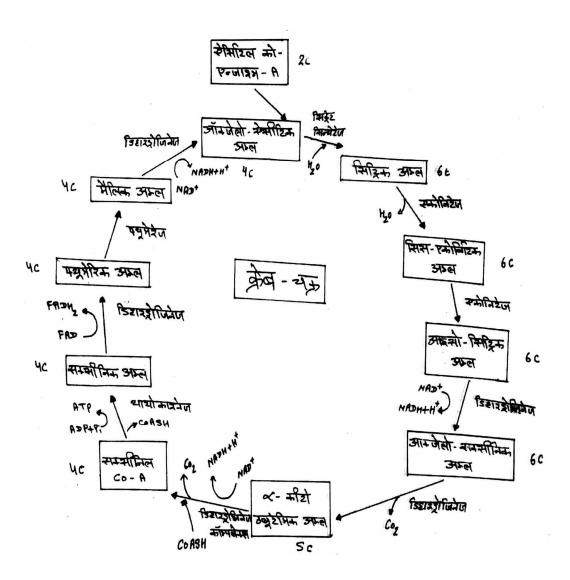
चित्र 1.23 [कोशिका में ऊर्जा संवटन]



चित्र 1.23 [कोशिका में ऊर्जा संवटन]



चित्र 1.25 क्रेब्स चक्र

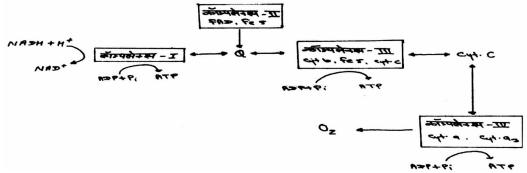


ऑक्सीडेटिव विकॉर्बोक्सीलीकरण - ऑक्सीजन की उपस्थिति माध्यम में होने पर जन्तु कोशिका ग्लाइको लाइसिस के उत्पाद पायरूविक ऐसिड को ऐसिटिल कोएन्जाइम ए तथा CO_2 में बदलती है । ऐसिटिल

कोएन्जाइम ए क्रेब के चक्र में भाग लेता है ।क्रेब चक्र ऑक्सीजन के माध्यम में उपस्थित होने पर ही होता है ।

क्रेब का चक्र - यह चक्र माइटोकोन्ड्रियल मैट्रिक्स में पूर्ण होता है । इसमें ऑक्सीकरण के फलस्वरूप CO_2 , व H_2O बनते है । साथ ही यह चक्र कोशिका को ATP, $NADH^+H^+$, $FADH_2$, GTP भी उपलब्ध कराता

ऑक्सीडेटिव फाक्फोरायलेशन - माइटोकोन्ड्रिया की आंतरिक झिल्ली में श्वसन श्रृंखला पाई जाती है जिसके क्रमिक ऑक्सीकरण से H^+ आयन मैट्रिक्स से बाहर दोनों झिल्लियों के बीच पहुंच जाते है । इस तरह H^+ ion की सांद्रण प्रवणता प्राप्त ATP निर्माण के लिये उत्तरदायी होती है । यहां NADH $^+H^+$ से 3 जबकि FADH $_2$ से दो ATP बनते है



चित्र 1.26 ऑक्सीडेटिव फॉस्फोरिलेशन

पेन्टोज फॉस्फेट-

ग्लूकोज के मेटाबोलिज़्म का एक पथ ग्लाइकोलाइसिस है इसके अलावा एक अन्य विकल्प HMP शंट (Pentose Phosphate pathway) है जिसमें ATP उत्पादन नहीं होता है बल्क NADPH का संश्लेषण होता है । NADPH की आपूर्ति ग्लाइकोलाइसिस एवं क्रेब चक्र से नहीं होती है । वसीय अम्ल और स्टीरॉइड के संश्लेषण में NADPH का उपयोग होता है । पेन्टोज फॉस्फेट पाथवे राइबोस शर्करा का भी संश्लेषण करता है जो न्यूक्लिक अम्ल के निर्माण में प्रयुक्त होती है ।

1.5 कोशिकीय झिल्ली परिवहन-

कोशिका अपनी आवश्यकताओं की पूर्ति के लिए बाहरी वातावरण से विभिन्न पदार्थी O_2 , पोषक पदार्थ, हार्मोन, सिग्नल्स इत्यादि को ग्रहण करती है तथा अनेक उत्सर्जी पदार्थ यूरिया CO_2 , स्त्रावी उत्पादों को बाहरी माध्यम में मुक्त करती है। कोशिकाओं के मध्य परस्पर विभिन्न प्रकार के सम्पर्क पाए जाते है जैसे टाइट जंक्शन, गेप जंक्शन इत्यादि। पदार्थी का यह परिवहन प्लाज्मा मैम्ब्रेन से या चैनल प्रोटीन से होकर हो सकता है। परिवहन निम्न प्रक्रियाओं के दवारा संभव है -

1.5.1 विसरण -

विलय के कण अधिक सान्द्रता से कम सान्द्रता की ओर "विसरण" द्वारा स्थान्तरित होते है जैसे ऑक्सीजन एवं कार्बनडाईऑक्साइड का RBC में विनिमय विसरण दवारा होता है।

सान्द्रण प्रवणता के कारण विलेय के अणु विसरण में स्थानान्तरित होते है । इस स्थानान्तरण के कारण एन्ट्रोपी बढती है और यह प्रक्रम ऊष्माक्षेपी हो जाता है । इस स्थानान्तरण में ऊर्जा खर्च नहीं होती है ।

1.5.2 परासरण -

परासरण में विलेय का नहीं वरन् विलायक का परिवहन प्लाज्मा मैम्ब्रेन से होकर उस दिशा में होता है जिस दिशा में विलेय की सान्द्रता तुलनात्मक रूप से अधिक होती है, और यह परिवहन (परासरण) तब तक होता रहता है जब तक प्लाज्मा मैम्ब्रेन के दोनों और की सान्द्रण प्रणवता बराबर नहीं हो जाती है।

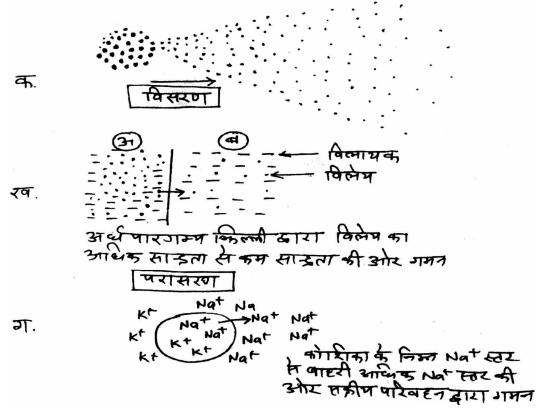
प्लाज्मा मैम्ब्रेन में इंटिग्रिल प्रोटीन अम्ल चैनल बनाते है जिनसे अनेक ions Na^+ , K^+ , $Ca^{+2}CI^{-1}$ इत्यादि विसरण द्वारा गमन करते है । ये आयन चैनल आयनों के लिए विशिष्ट होते है जिनसे कुछ विशेष प्रकार के आयन ही गुजर सकते है । तंत्रिका आवेग का संचरण, अन्तर कोशिका स्थान में पदार्थों का स्त्रावण परासरण द्वारा ही सम्पन्न होता है । प्लाज्मा मैम्ब्रेन की चैनल प्रोटीन के खुलने बंद होने के लिए विशिष्ट सिग्नल कार्य करते है । जैसे

- (1) वोल्टेज गेटिड चैनल मैम्ब्रेन के दोनो और के आवेश के अंतर के कारण खुलते व बंद होते है।
- (2) केमिकल गेटिड चैनल- इनका खुलना व बंद होना चैनल प्रोटीन से कुछ विशिष्ट पदार्थी के संयोजन से होता है।

फेसिलिटेटिड विसरण- ऐसे स्थानान्तरण में विलेय उच्च सान्द्रता से निम्न सान्द्रता की ओर स्थानान्तिरत होता है किन्तु यह विलेय कण प्लाज्मा मैम्ब्रेन के प्रोटीन से बंधित होकर स्थानान्तिरत होते है अतः इसे फेसिलिटेटिड विसरण कहते है । ग्लूकोज का स्थानान्तरण ट्रांसपोर्टर प्रोटीन दवारा फेसिलिटेटिड विसरण विधि से होता है ।

1.53 सक्रिय परिवहन -

प्लाज्मा मैम्ब्रेन द्वारा होने वाले इस परिवहन में अणुओं का परिवहन कम सान्द्रता से उच्च सान्द्रता की ओर होता



चित्र 1.27 (क)- विसरण (ख)- परासरण (ग)-सक्रीय परिवहन

है । यह परिवहन सान्द्रण प्रवणता के विरूद्ध होने के कारण इसमें ऊर्जा की आवश्यकता होती है । प्रायः यह ऊर्जा ATP के जलअपघटन से प्राप्त होती है जैसे- सोडियम पोटेशियम पम्प । इस पम्प द्वारा कोशिका अपने अंदर K^+ का उच्च एवं Na^+ निम्न सान्द्रता स्तर बनाए रखती है । इस पम्प द्वारा ATP के एक अणु के जलअपघटन से तीन Na^+ को कोशिका से बाहर निकाला जाता है तथा 2 K^+ को अन्दर लाया जाता है । परिवहन अणुओं द्वारा यह आवागमन सम्पन्न होता है ।

1.6 सारांश

प्राणी कोशिका में कोशिका झिल्ली कोशिका द्रव्य को घेरे रहती है । इसमें कोशिका भिति अनुपस्थित होती है । कोशिका झिल्ली की संरचना का विस्तृत अध्ययन सिंगर व निकोलसन के फ्लुइड मोजेक मॉडल से किया जा सकता है । कोशिका झिल्ली लिपिड व प्रोटीन की द्विस्तरीय संरचना है । कोशिका द्रव्य में माइटोकोन्ड्रिया ऑक्सीडेटिव फास्फोराइलेशन और ए.टी.पी उत्पादन में मदद करती है । इसकी बाहय सतह चिकनी जबिक आंतरिक सतह फोल्ड व इनवेजिनेशन द्वारा क्रिस्टी का निर्माण करती है । परॉक्सीसोम में भी माइटोकोन्ड्रिया की भांति ऑक्सीडेटिव मेटाबॉलिज्म होता है जिसमें मुख्य रुप से यह हाइड्रोजन परॉआक्साइड को जल में परिवर्तित कर देता है । लाइसोसोम कोशिका का पाचक अंगक है जो बायोमोलिक्यूल्स सैल डेबरिज, जीवाणु इत्यादि का भक्षण व पाचन करता है । अन्तःप्रद्रव्यी जालिका दो प्रकार की होती है, खुरदरी व

चिकनी अन्तःप्रद्रव्यी जालिका । अन्तःप्रद्रव्यी जालिका पदार्थों के परिवहन, प्रोटीन संश्लेषण के साथ ग्लाइकोजन व लिपिड के निर्माण में मदद करती है । गॉल्जी बॉडी चपटे सैक होते है जो स्त्रावी वैसिकल का निर्माण करते है । राइबोसोम प्रोटीन संश्लेषण में मदद करते है ।तारककाय प्राणी कोशिका में जोड़े में केन्द्रक के नजदीक होते है जो आधार काय पक्ष्माभिका, कशाभिका और तर्कु रेशों के निर्माण में सहायक होते है । पक्ष्माभिका तथा कशाभिका कोशिका को गित देने में मदद करते है । केन्द्रक झिल्ली द्वारा केन्द्रिका केन्द्रक द्रव्य व क्रोमिटिन पदार्थ घिरे रहते है ।

जैव ऊर्जिकी- कोशिका में विभिन्न कार्यों को सम्पन्न करने के लिए आवश्यक ऊर्जा के आदान-प्रदान का अध्ययन जैव ऊर्जिकी के अंतर्गत आता है। किसी भी कोशिका में दो प्रकार की उपापचयी क्रियाएं होती है-ऊष्माक्षेपी-जिनमें ऊर्जा मुक्त होती है। दूसरी ऊष्माशोषी-जिसमें ऊर्जा का उपयोग होता है। जन्तु कोशिका में ग्लूकोज से ग्लाइकोलाइसिस, क्रेब्स चक्र व ऑक्सीडेटिव फास्फोराइलेशन के द्वारा ऊर्जा की प्राप्ति होती है। परिवहन- कोशिका में विभिन्न पदार्थों का परिवहन विसरण, परासरण, फेसिलिटेटिड विसरण, सक्रीय व निष्क्रीय परिवहन के जिरए होता है।

1.7 शब्दावली :

- 1. उभयधर्मी :- जलस्नेही व जलविरागी दोनों प्रकार के समूहों का पाया जाना ।
- 2. कोशिकाभक्षण:- कोशिका की बाहय सतह द्वारा ठोस रुप में भोजन या अन्य पदार्थ का अर्न्तग्रहण ।
- 3. ऊष्माक्षेपी:- किसी रसायनिक अभिक्रिया के दौरान ऊष्मा का निष्कासन
- 4. ऊष्माशोषी:- किसी रसायनिक अभिक्रिया के दौरान ऊष्मा का अंर्तग्रहण ।
- 5. विसरण:- विलय के कणों का अधिक सांद्रता से कम सांद्रता की ओर गमन करना ।

1.8 संदर्भ ग्रंथ : डि रोबरटिस, अलबर्ट, कूपर

1.9 बोध प्रश्न:

	•	\sim		\		_
प्रश्न	Ί	निम्नलिखित	पश्चा र	ᅑ	उत्ता	टाः₋
71 (1)		1919 911 GIG	77,011	71	$\mathcal{L}(\mathbf{r})$	ωι. -

1. रिक्त स्थान भरो-

- 1.प्राणी कोशिका को सर्वप्रथम देखने का श्रेय दिया जाता है ।

प्रश्न 2. बहु विकल्पी प्रश्न

निम्न में से सही उत्तर कोष्ठक में लिखो:-

- 1. पादप कोशिका में कौनसा अंगक अन्पस्थित होता है:-
 - अ. माइटोकोन्डिया

ब. राइबोसोम

स. रिक्तिका

- द. तारककाय
- 2. कोशिका का शक्ति गृह किस अंगक को कहा जाता है:-

	अ. माइटोकोन्ड्रिया	ब. राइबोसोम
	स. रिक्तिका	द. केन्द्रक
3.	आत्मघाती थैली किस अंगक को क	हा जाता है:-
	अ. माइटोकोन्ड्रिया	ब. राइबोसोम
	स. रिक्तिका	द. लाइसोसोम
4.	निम्न में से कौनसा कथन सही है:-	
	अ. केन्द्रिका की खोज फोन्टोना ने	की थी।
	ब. चिकनी अत: प्रद्रव्यी जालिका की	जे सतह पर राइबोसोम उपस्थित नहीं होते हैं I
	स. सक्रीय परिवहन में कोशिका ए.त	टी.पी या अन्य ऊर्जा अणु का प्रयोग करती है ।
प्रश्न	न 3. निम्नलिखित प्रश्नों के उत्तर र	तंक्षिप्त में दो :-
	1. जन्तु कोशिका व पादप कोशिक	n में कोई दो महत्वपूर्ण अंतर लिखिए ।
	उत्तरः-	·
	2. प्लाज्मा मैम्ब्रेन के कोई दो का	र्य लिखिए ।
	उत्तर:-	
		स्रकी
	3. य परिवहन व निष्क्रीय परिवहन	न में अंतर लिखिए ।
	उत्तर:- :	
1	10 अभ्यासार्थ प्रश्न:-	
	10 012 31(113 71(4))	

- 2. माइटोकोन्ड्रिया की आंतरिक संरचना का वर्णन करो
- 3. अंतःप्रद्रव्यी जालिका की संरचना व कार्य प्रणाली समझाओ ।
- 4. पक्ष्माभिका व कशाभिका में अंतर लिखो ।

इकाई- 2

इन वीवो व इन विट्रो तंत्र । कोशिका संवर्धन, कोशिका संवर्धन तकनीक के लिए उपकरण व आवश्यक सामग्री कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला की बनावट।

IN VIVO AND IN VITRO SYSTEM. CELL CULTURE, EQUIPMENT AND MATERIALS FOR CELL CULTURE TECHNOLOGY. DESIGN AND LAYOUT OF CELL CULTURE LABORATORY.

इकाई की रूपरेखा

- 2.0 उद्देश्य
- 2.1 प्रस्तावना
- 2.2 कोशिका संवर्धन: सामान्य परिचय
 - 2.2.1 कोशिका संवर्धन के प्रकार
 - 2.2.2 कोशिका संवर्धन की आवश्यकताएं
 - 2.2.3 अधः स्तर, गैस वातावरण, तापक्रम, पी.एच.
 - 2.2.3.1 अध:स्तर
 - 2.2.3.2 गैस वातावरण
 - 2.2.3.3 तापक्रम,
 - 2.2.3.4 पी.एच.
 - 2.2.4 संवर्धन माध्यम एवं पूरक
- 2.3 कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला हेत् आवश्यक सामग्री एवं उपकरण
 - 2.3.1 सामान्य उपकरण
 - 2.3.2 विशिष्ट उपकरण
- 2.4 कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला निर्माण हेत् आवश्यकताएँ
 - 2.4.1 प्रयोगशाला स्थान
 - 2.4.2 वेंटिलेशन
 - 2.4.3 एसेप्टिक क्षेत्र
 - 2.4.4 इन्क्यूबेशन कक्ष
 - 2.4.5 दाब साम्य
 - 2.4.6 प्रयोगशाला सदस्य
 - 2.4.7 तैयारी क्षेत्र

- 2.4.8 संग्रहण क्षेत्र
- 2.4.9 निर्माण एवं सर्विसेज
- 2.5 प्रयोगशाला स्थापना
 - 2.5.1 निर्जमीकृत हेतु क्षेत्र
 - 2.5.2 सर्विस बैंच
 - 2.5.3 इन्क्यूबेशन
 - 2.5.4 गर्म कमरा
 - 2.5.5 हवा परिसंचरण
 - 2.5.6 ताप नियंत्रक
 - 2.5.7 अति तापन
 - 2.5.8 तापमापी
- 2.6 सारांश
- 2.7 शब्दावली
- 2.8 सन्दर्भ ग्रंथ
- 2.9 बोध प्रश्न
- 2.10 अभ्यासार्थ प्रश्न

2.0 उद्देश्य :

इस अध्याय की सहायता से हम कोशिका को शरीर के बाहर जीवित रखने के लिए तथा उसकी वृद्धि के लिये आवश्यक माध्यम तथा अन्य जरूरी वस्तुओं के बारे में ज्ञान अर्जित करेंगे।

कोशिका संवर्धन के वृहद मात्रा में उत्पादन से हम इसका मानव जीवन, चिकित्सा, औषधी निर्माण, कृषि आदि महत्वपूर्ण क्षेत्रों में इसका प्रयोग कर सकते है।

2.1 प्रस्तावनाः

इन वीवो वह तंत्र है जिसमें कोशिका, ऊतक अंग का जन्तु के शरीर के अंदर अध्ययन किया जाता है जबिक इन विट्रो तंत्र में कोशिका, ऊतक या अंग को बाहरी संवर्धन माध्यम में रख कर उसका अध्ययन किया जाता है।

इन विट्रो तंत्र, इन वीवो तंत्र की. अपेक्षा अधिक सरल तथा सही है । इन विट्रो तंत्र में किसी भी विशेष भाग की कोशिकाओं को अलग-अलग कर उनको बाहरी संवर्धन माध्यम में रखकर उनका अध्ययन किया जा सकता हैं जबिक इन वीवो तंत्र में शरीर की कोशिकाएँ आसपास की अन्य कोशिकाओं को भी प्रभावित करती है तथा इन पर होने वाले अध्ययन में यह पता नहीं चल पाता है कि पदार्थ का कोशिका पर प्रभाव परोक्ष है अथवा समीपवर्ती कोशिकाओं पर होने वाले प्रभाव के कारण है।

इन विट्रो तंत्र में कोशिकाओं या ऊतकों में विशिष्ट कोशिका अंतःक्रिया गुण लगातार कम होता जाता है जिससे कोशिकाएँ विसरित या फैल कर गतिशील अवस्था में वृद्धि करना प्रारंभ कर देती है 1 इन विट्रो तंत्र में ग्लाइकोलाइसिस क्रिया के कारण ऊर्जा उपापचय वृहद मात्रा में होता है हालांकि क्रेब चक्र भी इस दौरान कार्यरत रहता है लेकिन यह कम सक्रीय होता है । इस अध्याय के अन्तर्गत हम निम्नांकित बिन्दुओं का अध्ययन करेंगे:-

- (1) कोशिका संवर्धन क्या होता है? कोशिका सवंधन कितने प्रकार का है?
- (2) कोशिका संवर्धन में कोशिका की वृद्धि के लिये कौन-कौन सी आवश्यकताएँ हैं।
- (3) कोशिका संवर्धन के लिये प्रयोगशाला का स्थापित करना तथा प्रयोगशाला के निर्माण में कौन-कौन सी आवश्यक सामग्री की आवश्यकता होती है।

2.2 कोशिका संवर्धन: सामान्य परिचय

कोशिका संवर्धन में मुख्यतया तीन प्रकार की कोशिकाएं पाई जाती है

- (1) स्तम्भ कोशिका
- (2) पूर्ववर्ती कोशिका
- (3) विभेदित कोशिका
- (1) स्तम्भ कोशिका ये अविभेदित कोशिकाओं का समूह होता है जो कि परिस्थिति के अनुसार अपने किसी निश्चित प्रकार की कोशिका में विभेदित हो जाती है ।
- (2) पूर्ववर्ती कोशिका ये कोशिकाएँ स्तम्भ कोशिकाओं से रूपान्तरित होती है लेकिन ये पूर्णतया विभेदित नहीं होती है, ये कोशिकाएं वृद्धि करने की क्षमता रखती है ।
- (3) विभेदित कोशिकाएं- विभेदन के पश्चात् बनने वाली कोशिकाओं को कहते हैं जिनमें आगे विभेदित होने की क्षमता नहीं रहती है।

कुछ कोशिका संवर्धन जैसे एपिडर्मल किरेटोनोसाइट्स संवर्धन में तीनों प्रकार की कोशिकाएँ उपस्थित होती है इसमें स्तम्भ कोशिकाएं नियत रूप से उपस्थित होती है जो कि आगे पूर्ववर्ती कोशिकाओं में विभेदित होकर विभेदित कोशिकाएं बनाती है अर्थात कोशिका संवर्धन के रख रखाव में स्तम्भ कोशिकाओं की महत्वपूर्ण आवश्यकता होती है । सामान्य रूप से कम कोशिका सघनता, कैल्शियम आयन की कमी तथा उच्च वृद्धि कारकों के द्वारा कोशिका विभाजन को बढ़ाया जा सकता है जबकि विभेदन को बढाने के लिये इसके विपरित अवस्था रखनी होती है । संवर्धन में प्रयुक्त किये जा रहे कोशिका स्त्रोत के अनुसार उसमें स्तम्भ कोशिकाएँ, पूर्ववर्ती कोशिकाएँ तथा विभेदित कोशिकाओं का अनुपात अलग अलग होता है ।

2.2.1 कोशिका संवर्धन के प्रकार- कोशिका संवर्धन मुख्य रूप से दो प्रकार से प्राप्त करते है । मोनोलेयर संवर्धन ।

निलम्बन संवर्धन ।

मोनोलेयर संवर्धन -कोशिका संवर्धन के समय जब एकल कोशिकाओं के समूह को संवर्धन माध्यम में डाल दिया जाता है तो वे आधार के साथ एक कोशिकीय परत का निर्माण करती है । इस प्रकार के संवर्धन को मोनोलेयर संवर्धन कहते है ।

निलम्बन संवर्धन:- कुछ विशेष प्रकार की कोशिकाओं की वृद्धि के लिये तरल माध्यम की आवश्यकता होती है जिसे निलम्बन संवर्धन कहते है।

इसके लिए अंतिम लेगफेज प्रावस्था से विलगित कोशिकाओं को ताजा तरल माध्यम में स्थानान्तिरत किया जाता है तथा तापक्रम 37 डिग्री सेन्टीग्रेड रखा जाता है । संवर्धन को लगभग 200-350 आर.पी.एम पर लगातार हिलाये हुए रखा जाता है । ऑक्सीजन की सांद्रता, पी एच, हानिकारक पदार्थों की उपस्थिति (उदाहरण अमोनिया) आदि संवर्धन को प्रभावित करते है ।

इसके लिये वृद्धि वक्र प्रारूपिक रूप से "सिगमॉइड" रूप में प्राप्त होता है जिसमें 2-24 घंटे के लिये लेग प्रावस्था, फिर लोग प्रावस्था तथा अंत में स्थिर प्रावस्था होती है तथा इसके बाद कोशिकाओं में नेक्रोसिस (मरण) शुरू हो जाती है।

- 2.2.2 कोशिका संवर्धन की आवश्यकताएँ -कोशिकाओं को शरीर के बाहर रखकर संवर्धन हेतु दो प्रमुख आवश्यकताएँ होती हैं । प्रथम कोशिकाओं के चारों तरफ का वातावरण जिसमें कि उन्हें संवर्धित करना हैं, द्वितीय कोशिकाओं की सामान्य उपापयच प्रक्रियाओं को सम्पन्न करने के लिए आवश्यक पोषक पदार्थ ।
- 2.2.3 अधः स्तर, गैस वातावरण, तापक्रम, पी.एच. -संवर्धन वातावरण के जो प्रमुख घटक हैं वे हैं अधःस्तर जहाँ की कोशिकाओं को संवर्धन हेतु आधार चाहिए,गैस वातावरण जोकि संवर्धन माध्यम में उपस्थित गैसों के कारण होता है, तापक्रम जिस पर कि कोशिकाओं को संवर्धित किया जाता है तथा वातावरण का पी.एच. जिसमें की कोशिकाएँ संवर्धित की जाती है।
- 2.2.3.1 अधः स्तर- कोशिका संवर्धन में कोशिका की वृद्धि के लिये एक आधार की आवश्यकता होती है जिस पर ये कोशिकाएं आसानी से वृद्धि कर सके अर्थात कोशिका संवर्धन के लिये संवर्धित कोशिकाओं की वृद्धि के लिए आवश्यक स्तर को अधः स्तर कहते है।

कोशिका संवर्धन में कई प्रकार के अधःस्तर प्रयुक्त किए जाते है जैसे कि काँच, प्लास्टिक, धातु आदि ।

काँच: मुख्य रूप से परखनली, फ्लास्क आदि का प्रयोग कोशिका संवर्धन हेतु किया जाता है। इसको आसानी से धोया, निर्जलीकृत तथा पारदर्शी होने से कोशिकाओं में होने वाले परिवर्तनों को सीधे ही देखा जा सकता है। उदाहरणार्थ - पाइरेक्स के काँच मुख्य रूप से काम में लिये जाते है परन्तु ये माध्यम की पी.एच को बढा देते है। अतः इनको काम में लेने से पहले अन्त से क्रिया करा लेना चाहिए।

प्लास्टिक: ये नोन ऑटोक्लेवेबल होते हैं तथा इनको एक बार ही प्रयुक्त किया जाता है । उदाहरणार्थ - पोलीस्टाइरिन, पोलीरबारिलन पोली कार्बोनेट, पी वी सी, टेफ्लान, सेलोफोन तथा सेलुलोज एसीटेट को मुख्य रूप से प्रयुक्त किया जाता है ।

धातु : स्टेनलैस स्टील तथा टाइटेनियम धातु का अधः स्तर के रूप में मुख्यतयाः प्रयोग किया जाता है ये मुख्यतया रासायनिक अक्रीय तथा ऋणात्मक आवेशित लिए होती है ।

2.2.3.2 गैस वातावरण- कोशिकाओं के चारों तरफ उपस्थित माध्यम में स्थित आवश्यक गैसों की मात्रा जिसमें प्रमुख है ऑक्सीजन व कार्बन डाइ आक्साइड । ऑक्सीजन की आवश्यकता संवर्धन माध्यम की ऊपरी परत से विसरण द्वारा पूरी की जाती है इसी कारण माध्यम की गहराई 2 से 5 मि.मी. उत्तम रहती है । चूंकि कार्बन डाई आक्साइड पानी के साथ कार्बोनिक अम्ल का

निर्माण करती है अतः इसके आधिक्य से पी.एच. कम हो जाता है इसलिए कार्बन डाई आक्साइड की मात्रा सम्चित रखनी चाहिए।

- 2.2.3.3 तापक्रम-कोशिकाओं के जैविक स्त्रोत के आधार पर संवर्धन किस तापक्रम पर किया जाना है निर्धारित किया जाता है सामान्यतया ऊष्ण रक्त तापी (Warm blooded animal) की कोशिकाओं को 36.5 डिग्री सें. तापक्रम पर संवर्धित किया जाता है जबिक शीत रक्त तापी (Cold blooded animal) जन्तु से प्राप्त कोशिकाओं को जन्तु के आवासीय तापक्रम के अनुसार संवर्धित किया जाता है । पक्षियों की कोशिकाओं के लिए 38.5 डिग्री तापक्रम उत्तम रहता है ।
- 2.2.3.4 पी.एच. (pH)-संवर्धन माध्यम का पी.एच. अधिकांश कोशिकाओं के लिए 7.4 अनुकूलतम होता है। हालांकि यह कोशिकाओं के प्रकार पर भी निर्भर करता है कि, पी.एच. कितना होना चाहिए जैसे कि फाइब्रोब्लास्ट कोशिकाएं 7.4 से 7.7 तक अच्छी तरह से जीवित रहती है।
- 2.2.4 संवर्धन माध्यम एवं प्रक-कोशिकाओं को जीवित रहने व वृद्धि करने के लिए पोषक माध्यम की आवश्यकता होती है । इस माध्यम में उचित पोषक पदार्थ निश्चित मात्रा में उपस्थित होने चाहिए । ये पोषक पदार्थ जलीय माध्यम में न केवल कोशिकाओं का पोषण करते हैं बल्कि एक निश्चित श्यानता, पृष्ठ तनाव व आयिनक संतुलन भी प्रदान करते है । संवर्धन माध्यम में संतुलित लवण विलयन (Balanced Salt Solution) होता है जिसके प्रमुख घटक हैं अकार्बनिक लवण जैसे कि सोडियम बाई कार्बोनेट, सोडियम क्लोराइड, मैग्नीशियम क्लोराइड, कैल्शियम क्लोराइड आदि । इसके अतिरिक्त संवर्धन माध्यम में बफर, अमीनो अम्ल, ग्लूकोज,विटामिन आदि होते हैं ।

संवर्धन माध्यम के पूरक वे रसायन होते हैं जोकि कुछ विशिष्ट कोशिकाओं की वृद्धि व उपापचय के लिए आवश्यक होते हैं जैसे कि इन्सुलिन हार्मोन, वृद्धि कारक, सीरम इत्यादि । वह संवर्धन माध्यम जिसमें कि घटकों की निश्चित मात्रा इंगित होती है उसे परिभाषित माध्यम (Defined media) जैसे कि MEM (Minimum Essential Medium) ईगल, लीबोवित्स माध्यम इत्यादि ।

2.3 कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला हेतु आवश्यक सामग्री एवं उपकरणः

कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला की स्थापना के लिये आवश्यक सामग्री तथा उपकरणों की जरूरत प्रयोगशाला में अनुसंधान कार्यक्रम व अनुसंधान की योग्यता पर निर्भर करता है । किसी भी प्रयोगशाला को स्थापित करने के लिये निम्न उपकरणों की आवश्यकता होती है ।

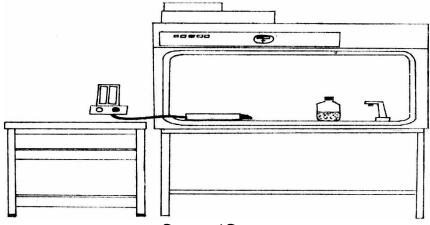
2.3.1 सामान्य उपकरणः

कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला के लिए कुछ आवश्यक उपकरण निम्न सारणी में दिए गए है।

काँच का सामान		मात्रा	
फ्लास्क (कोनिकल)	1 लीटर		1
	500 एम.ए	ल .	4
	250 एम.ए	ત્ .	6
बीकर	500 एम.ए	ल. से 1000 एम	.एल. तक 1 प्रत्येक
मापक सिलेण्डर	1 लीटर		1
	500 एम.ए	ਕ .	2
	50 एम.एल		5
	10 एम.एल		2
वोल्यूमेट्रिक फ्लास्क	1 लीटर		1
	500 एम.ए	ત્ .	2
	100 एम.ए	ल .	2
पेट्रीडिश	85 एम.एल		4 दर्जन
	60 एम.एल		4 दर्जन
डिश स्टेण्ड			2
मेडीकल फ्लेट बोतल	16 0Z.		6 दर्जन
	12 0Z.		6 दर्जन
परखनली	6 "X 5/8"		2 दर्जन
	3 "X 1/2"		1 दर्जन
अपकेन्द्रीकरण ट्यूब			6 दर्जन
परखनली होल्डर			6 दर्जन
परखनली रेक			6 दर्जन
पिपेट	100 एम.ए	ત્ .	6 दर्जन
	10 एम.एल	· ·	6 दर्जन
	5 एम.एल.		6 दर्जन
	1 एम.एल.		6 दर्जन
पिपेट बल्ब	100 एम.ए	ल.	1
वॉच ग्लास			1 दर्जन
कॉटन			2 बंडल
फिल्टर			6 पैकेट
डबल डिस्टीलेशन उपकरण	2 लीटर		2
पुर्नचक्रण जल तकनीक युक्त			

2.3.2 विशिष्ट उपकरण- प्रयोगशाला के लिए मुख्य आवश्यक उपकरण निम्न है:-

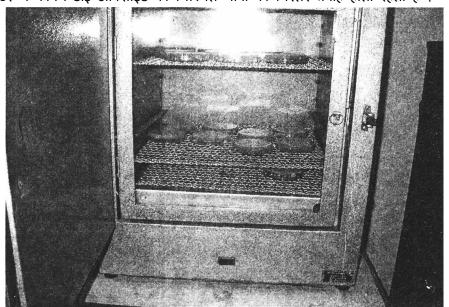
- एक फ्रिज जिसमें डिप-फ्रिज साथ हो ।
- एक या अधिक इन्क्यूबेटर
- एक अपकेन्द्रीकरण
- एक संवेदनशील तोलने की मशीन
- एक निर्जलीकृत ओवन
- एक ऑटोक्लेव या प्रेशर क्कर
- एक पिपेट वॉशर
- एक डिआयोनाइजर
- बाल्टी, पेन आदि जो कि काँच के उपकरणों के संग्रहण तथा सफाई में काम आए
- सूक्ष्मदर्शी (यदि प्रयोगशाला में वृहद मात्रा में कार्य हो तो विशेष रूप से इनर्वटेड सूक्ष्मदर्शी)
- काँच के उपकरणों तथा विशेष उपकरणों की प्रयोगशाला कक्ष में अलग-अलग आवश्यकता।



चित्र 2.1 लेमिनार वायु प्रवाह

लेमिनार वायु प्रवाह- इस उपकरण की सहायता से कार्य स्थल पर निर्जमीकृत स्वच्छ हवा का संचारण चलता रहता है जिससे कि प्रयोगशाला कक्ष में धूल तथा जीवाणु कण यदि उपस्थित हो तो कोशिका संवर्धन स्थान पर ये प्रवेश नहीं कर पाते । अधिकांशतः व्यक्तिगत स्वच्छ केबिनेट हुड प्रयुक्त की जाती है जिसके अलग अलग प्रयुक्त करने वाले होते है तथा इसमें केवल काम करने वालों के हाथ इसके अंदर प्रविष्ट होते है तथा इसमें कोई अलग से केबिनेट हिस्सा नहीं होता है । लेमिनार वायु प्रवाह में कार्य करने वाले को हाथों में दस्ताने तथा एप्रेन पहननी चाहिए जिससे प्रदूषण की संभावना को कम से कम किया जा सके । लेमिनार में काम करने के लिए कुर्सी ऊंची तथा पीछे मुडने वाली होनी चाहिए जिसे आसानी से काम हो सके ।लेमिनार वायु प्रवाह के फिल्टर को समय-समय पर साफ करते रहना चाहिए ।

इन्क्यूबेटर - इस उपकरण में कोशिकाओं को संवर्धित कर रखा जाता है । कार्बन डाइ आक्साइड इन्क्यूबेटर और साधारण इन्क्यूबेटर (चित्र 2.2) में यह भिन्नता होती है कि कार्बन डाइ आक्साइड इन्क्यूबेटर में कार्बन डाइ आक्साइड की निश्चित मात्रा का निरंतर प्रवाह होता रहता है ।



चित्र 2.2 इन्क्यूबेटर में संवर्धित कर पेट्रीडिश में रखी गई कोशिकाएं

2.4 कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला निर्माण हेत् आवश्यकताएं:

कोशिका संवर्धन के लिये कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला का साफ-स्वच्छ तथा प्रदूषण रहित होना अति आवश्यक है । हालांकि इसके लिये प्रयोगशाला का धूल रहित होना चाहिए । लेमिनार हवा प्रवाह के दवारा प्रयोगशाला में इस समस्या को सम्पूर्णतयाः हल किया जा सकता है ।

प्रयोगशाला बनाते समय काफी वस्तुओं के बारे में ध्यान रखा जाता है जैसे कि क्या नई प्रयोगशाला बनाना जरूरी है या पहले की प्रयोगशाला में ही कुछ परिवर्तन कर कोशिका संवर्धन किया जावे । प्रयोगशाला निर्माण के समय निम्न आवश्यकताओं को ध्यान में रखा जाता है ।

2.4.1 प्रयोगशाला स्थान - सबसे ज्यादा स्थान तैयारी कक्षा के लिए रखा जाता है जिसमें संगणक, अपकेन्द्रीकरण, इन्क्यूबेटर, सूक्ष्मदर्शी तथा कुछ अभिकर्मकों का संग्रह, संवर्धन माध्यम, कांच के तथा प्लास्टिक के उपकरण रखे जाते है ।

इसके बाद दूसरा बड़ा स्थान जहां पर धुलाई, विभिन्न अभिकर्मकों की तैयारी तथा निर्जमीकरण किया जाता है । तृतीय रूप से संग्रहण तथा चौथा और अंतिम रूप से इन्क्यूबेशन होता है जिसमें लेमिनार वायु प्रवाह तथा विभिन्न प्रकार के इन्क्यूबेटरस होते हैं ।

2.4.2 वेंटिलेशन -प्रयोगशाला में स्वच्छ निर्जमीकृत हवा का प्रवाह निरंतर चलते रहना चाहिए जिससे कि सूक्ष्मजीवी फफूँद आदि का संक्रमण कम से कम हो । चित्र 2.3 में इसे पंखे के रूप में दिखाया गया है ।

- 2.4.3 निर्जमीकरण क्षेत्र -प्राणी ऊतक सवंर्धन प्रयोगशाला पूर्णरूपेण चारों ओर से बंद होनी चाहिए । कमरे में उपस्थित खिडिकयां पूर्ण रूपेण बंद होनी चाहिए अन्यथा कमरे में ऊष्मा के भरण में वृद्धि, माध्यम का अनवरत किरणों द्वारा विकृतिकरण तथा अन्य हानिकारक जीवों का प्रभाव हो सकता है ।
- 2.4.4 इन्क्यूबेशन कक्ष -ताप, गैस प्रावस्था, कार्य क्षेत्र के स्थान तथा आकार के आधार पर अलग अलग प्रकार के इनक्यूबेशन कक्ष बनाये जाते है । सामान्यतया बड़े फ्लास्कों तथा अधिक संख्या में होने पर इन्हें सीलबंद करके एक कक्ष में इन्क्यूबेशन किया जाता है जबिक खुले हुए प्लेट तथा फ्लास्कों के लिये CO₂ इन्क्यूबेटर प्रयुक्त किया जाता है ।
- 2.4.5 दाब साम्य -आदर्श रूप से कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला में चारों के माध्यम का धनात्मक दाब होना चाहिए जिससे कि बाहर से संदूषित वायु का प्रवेश न हो सके । प्राणी कोशिका संवर्धन अति संवेदनशील होता है अतः प्रयोगशाला रूपरेखा (डिजाइन) करते समय दाब साम्य का विशेष ध्यान रखा जाना चाहिए ।
- 2.4.6 प्रयोगशाला सदस्य -िकतने लोग एक साथ प्रयोगशाला में काम करेंगे, प्रत्येक सप्ताह सभी सदस्य िकतना काम करते हैं, तथा िकस प्रकार के संवर्धन को सविधित करते हैं? इन सभी बातों के आधार पर ही प्रयोगशाला में लेिमनार हवा प्रवाह कक्ष की संख्या निर्भर करती है तथा साथ ही जैव अभिकर्मक, प्राणी ऊतक विच्छेदन तथा बड़ी मात्रा में संवर्धन करने के लिये एक वृहद मात्रा में स्थान की आवश्यकता होती है । सामान्य रूप से 50 सदस्यों के बीच में कम से कम 12 लेिमनार वायु प्रवाह कक्ष होने चाहिए ।
- 2.4.7 तैयारी क्षेत्र निर्जमीकरण तथा उपकरणों को धोने के लिये या तो जिस क्षेत्र में ये प्रिक्रिया हो वह बंद हो या एक अलग से कक्ष हो जिसके द्वारा ऑटोक्लेव से निकलने वाली हवा तथा वाष्प आसानी से बाहर निकल सके ।
- 2.4.8 संग्रहण क्षेत्र जिस प्रकार का कार्य किया जा रहा है तथा काँच के उपकरण, प्लास्टिक के उपकरण आदि के संग्रहण के लिये कितने कार्य क्षेत्र की आवश्यकता है, यह अति महत्वपूर्ण होता है।

इसके अतिरिक्त इन्क्यूबेशन कक्ष, फ्लोरोसेन्स सूक्ष्मदर्शी तथा फोटो माइक्रोस्कोपी के लिये भी अलग से कक्ष होने चाहिए । यदि प्रयोगशाला कक्ष में सभी सुविधायें अलग अलग प्रकार से दी जाए तो संदूषण से बचा जा सकता है । प्रयोगशाला में नियमित रूप से काम में आने वाले रंजको तथा अभिकर्मकों को कोशिका

संवर्धन संग्रहण से पृथक रखना चाहिए ।

2.4.9 निर्माण एवं सेवाएं - प्रयोगशाला कक्षा में संदूषण नहीं हो इसके लिए धनात्मक दाब प्रावस्था होनी चाहिए जिससे अंदर से बाहर वाष्प या ऊष्मा का प्रवाह हो सके अर्थात कक्षा में सम्पूर्ण रूप से स्वच्छ हवा का आवागमन होना चाहिए।

प्रयोगशाला की आसानी सें धुलाई हो जानी चाहिए तथा टेबिल, मेज इस प्रकार से व्यवस्थित हो कि उनमें नीचे से धूल आसानी से हटाई जा सके । फर्श को साफ करने के लिये फिनाइल या किसी धूल संरक्षक से साफ करना चाहिए । प्राणी कोशिका संवर्धन कक्ष जहां तक हो सके धुलाई, तैयारी तथा निर्जमीकरण कक्ष से पृथक होना चाहिए । धुलाई कक्ष में पर्याप्त रूप से पानी की सुविधा होनी चाहिए । कक्ष में अभिकर्मकों, ट्रालियों, टेबलों तथा सदस्यों को इस प्रकार व्यवस्थित होना चाहिए कि कक्ष में पर्याप्त मात्रा में स्थान हो । आसुत जल बनाने के लिए पुर्नचक्रण जल विधि का प्रयोग करना चाहिए जिससे जल का दुरूपयोग नहीं हो ।

सर्विस में मुख्यतयाः बिजली सप्लाई, घरेलू गैस सिलेण्डर, CO₂, संघनित गैस निर्वात आदि सिम्मिलित किए गए है । कक्ष निर्माण के समय उपकरणों के कक्षों को रखने के स्थान के अनुसार बिजली की फिटिंग करवानी चाहिए । जहां तक हो सके बिजली सप्लाई, उपकरण के पास ही हो तथा उसकी क्षमता उपकरण के अनुसार होनी चाहिए । बिजली सप्लाई को प्रयोगशाला कक्ष में आसानी से व्यवस्थित किया जा सकता है ।

2.5 प्रयोगशाला स्थापना :

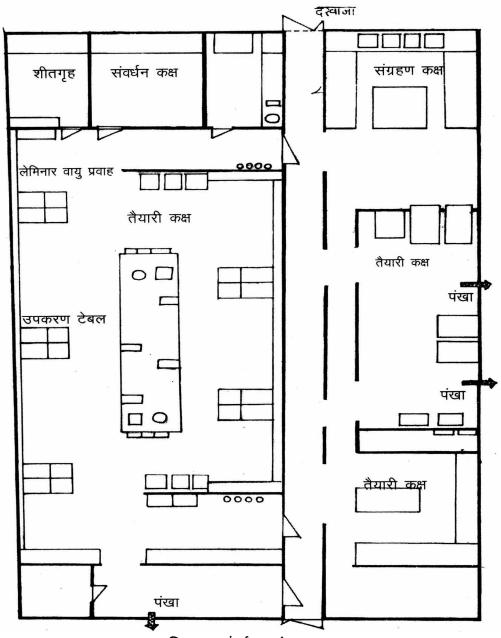
किसी प्रयोगशाला को स्थापित करने के लिए प्रमुख रूप से निम्न बातें महत्वपूर्ण है-निर्जमीकरण, इन्क्यूबेशन तैयारी, धुलाई तथा संग्रहण आदि करने के लिए केवल एक ही कक्ष का प्रयोग किया जा रहा हो तो निर्जमीकरण पर इसका प्रतिकूल प्रभाव पड़ता है।

- 2.5.1 निर्जमीकरण हेतु क्षेत्र: यह स्थान प्रयोगशाला कक्षा में एक अलग ही भाग में होता है जो कि कोशिका सर्वर्धन के ही काम आता है अर्थात इस भाग में किसी और प्रकार का यीस्ट या जीवाणु का संवर्धन नहीं किया जाता है । कक्षा में कार्य क्षेत्र, साधारण रूप से प्लास्टिक लेमिनेटेड या सफेद रंग का होना चाहिए जिससे संवर्धन तथा विच्छेदन सम्बन्धी प्रेक्षण आसानी से देखे जा सके । टेबल की सतह पर किसी भी प्रकार की सामग्री को संग्रह नहीं करना चाहिए ।
- 2.5.2 सर्विस बैंच- ऊतक संवर्धन तकनीक कक्ष में एक टेबल होनी चाहिए जिस पर संगणक, सूक्ष्मदर्शी

आदि उपकरण रखे हो जिससे काम करने में आसानी होती है।

- 2.5.3 इन्क्यूबेशन प्रयोगशाला कक्ष में स्वच्छ हवा, कक्ष में कम सदस्यों की संख्या आदि कई ऐसे कदम है जिसके द्वारा धूल, कीटाणु तथा अन्य कई कारकों को कम से कम किया जाता है जिससे इन्क्यूबेशन कक्ष निर्जमीकृत रह सके ।
- 2.5.4 गर्म कमरा यदि प्रयोगशाला कक्ष में पर्याप्त स्थान हो तथा संवर्धन अधिक मात्रा में करना हो तो किसी कक्ष को इन्क्यूबेटर की तरह प्रयुक्त किया जा सकता हैं। इसके लिए इसकी दीवारें किसी कुचालक से लेपित होनी चाहिए जो कि फाइबर ग्लास या मिनरल वूल की बनी होती है। गर्म कक्ष का तापमान इन्क्यूबेशन तापक्रम से $\pm 5^{\circ}$ C तक नियंत्रित होना चाहिए जिसके लिये संवेदनशील तापक्रम नियंत्रक होना चाहिए।
- 2.5.5 हवा परिसंचरण -कोशिका संवर्धन कक्ष में स्वच्छ हवा का परिसंचरण नियमित रूप से होना चाहिए तथा वेंटिलेटर पंखों की सहायता से दूषित हवा का निष्कासन भी बना रहना चाहिए।
- 2.5.6 ताप नियंत्रक इसकी सहायता से किसी निश्चित तापमान को निर्धारित करके अलग अलग समय के अनुसार ऊष्मा प्रदान की जाती है । तापमान को चिन्हित संख्या से अधिक नहीं किया जाना चाहिए ।

- 2.5.7 अतितापन कई बार अवांछित रूप से ऊष्मा का उत्पादन हो जाता है जो कि प्रयोगशाला कक्ष में मुख्यतयाः (1) गर्मियों में तापमान बढने से (2) प्रयोगशाला कक्ष में मोटर, रोलर रेक्स, मैंगनेटिक स्टेरर लेमिनार वायु प्रवाह आदि के ऊष्मा निष्कासन से उत्पन्न हो जाती है । हीट रूम में ऐसे उपकरण नहीं रखे जाने चाहिए जो कि ऊष्मा उत्पादन में सहायक हो ।
- 2.5.8 तापमापी प्रयोगशाला कक्ष में तापमान की जानकारी के लिए तापमापी तथा इसके सम्बन्धित चार्ट होना चाहिए जिससे इसका पूरा ब्यौरा लिया जा सके । इस चार्ट को हर सप्ताह बदल देना चाहिए । हो सके तो चार्ट के पीछे एक अत्यधिक और न्यूनतम चेतावनी वाली लाइट होनी चाहिए जिसको आसानी से देखा जा सके ।



चित्र 2.3 संवर्धन प्रयोगशाला का प्रारूप

2.6 सारांश

एक कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला को स्थापित करने तथा इसके निर्माण के लिये आवश्यक सामग्री एक महत्वपूर्ण अध्ययन है । इन वीवो वह तंत्र है जिसमें कोशिका, ऊतक अंग का जन्तु के शरीर के अंदर अध्ययन किया जाता है जबकि इन विट्रो तंत्र में कोशिका, ऊतक या अंग को बाहरी संवर्धन माध्यम में रख कर उसका अध्ययन किया जाता है ।कोशिका संवर्धन मुख्य रूप से दो प्रकार से प्राप्त करते है । मोनोलेयर संवर्धन व निलम्बन संवर्धन कोशिकाओं को शरीर के बाहर रखकर संवर्धन हेत् दो प्रमुख आवश्यकताएं होती हैं । प्रथम कोशिकाओं के चारों तरफ का वातावरण जिसमें कि उन्हें संवर्धित करना हैं, दवितीय कोशिकाओं की सामान्य उपापयच प्रक्रियाओं को सम्पन्न करने के लिए आवश्यक पोषक पदार्थ ।संवर्धन वातावरण के जो प्रमुख घटक हैं वे हैं अधःस्तर जहाँ की कोशिकाओं को संवर्धन हेत् आधार चाहिए,गैस वातावरण जोकि संवर्धन माध्यम में उपस्थित गैसों के कारण होता है, तापक्रम जिस पर कि कोशिकाओं को संवर्धित किया जाता है तथा वातावरण का पी.एच. जिसमें की कोशिकाएं संवर्धित की जाती है ।कोशिकाओं को जीवित रहने व वृद्धि करने के लिए एक पोषक माध्यम की आवश्यकता होती है । इस माध्यम में उचित पोषक पदार्थ निश्चित मात्रा में उपस्थित होने चाहिए । संवर्धन माध्यम के पूरक वे रसायन होते हैं जोकि कुछ विशिष्ट कोशिकाओं की वृद्धि व उपापचय के लिए आवश्यक होते हैं जैसे कि इन्स्लिन हार्मोन, वृद्धि कारक, सीरम इत्यादि । कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला की स्थापना के लिये आवश्यक सामग्री तथा उपकरणों की जरूरत प्रयोगशाला में अन्संधान कार्यक्रम व अनुसंधान की योग्यता पर निर्भर करता है ।कोशिका संवर्धन के लिये कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला का साफ-स्वच्छ तथा प्रदूषण रहित होना अति आवश्यक है ।लेमिनार हवा प्रवाह के द्वारा प्रयोगशाला में इस समस्या को सम्पूर्णतयाः हल किया जा सकता है ।

2.7 शब्दावली:

- (i) प्रचुरोद्भवन- कोशिका का तेजी से वृद्धि करना ।
- (ii) इन्क्यूवेटर एक विशेष धातु निर्मित बॉक्स जिसमें कोशिकाओं की नियत ताप पर वृद्धि की जाती है ।
- (iii) निलम्बन सर्वर्धन प्राणी कोशिकाओं को पररपर विलगित कर उन्हें जलीय संवर्धन माध्यम में विस्थापित कर वृद्धि करना ।

2.8 सन्दर्भ ग्रन्थ :

कल्चर ऑफ एनिमल सेल्स-आर.इआन.फ्रेशने-विल्ली- लिस

2.9 बोध प्रश्न :

- 1. सवंधिंत कोशिकाओं की वृद्धि के लिए आवश्यक स्तर को कहते है ।
- 2. प्रयोगशाला कक्ष में संदूषण नहीं हो सके इसके लिए दाब प्रवणता होनी चाहिए।

3.			-	ने वाला अधः				
		अ. कांच का		ब. प्लास्टिक	न का			
	:	प्त. धातु का		द. उपरोक्त	सभी			
4.	कोशिव	न संवर्धन में	ं गैस तथा '	नी.एच. का क	या महत्व	} ?		
376	ार:						 	
5.	निलम	बन संवर्धन व	क्या है?					
376	ार:-						 	

2.10 अभ्यासार्थ प्रश्न :

- 1. इन वीवो व इन विट्रो तंत्र क्या है?
- 2. कोशिका संवर्धन में स्तम्भ कोशिकाओं के बारे में बताइए ।
- 3. कोशिका संवर्धन में प्रयुक्त अधः स्तरों का वर्णन करो ।
- 4. लेमिनार वायु प्रवाह की उपयोगिता बताइए ।
- 5. संवर्धन व पूरक माध्यम क्या हैं?
- 6. कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला हेतु सामान्य उपकरणों की सूची लिखें ।
- 7. कोशिका संवर्धन प्रयोगशाला के प्रारूप का वर्णन कीजिए ।

कोशिका संवर्धन की आवश्यकताएँ- संवर्धन वातावरण अधःस्तर, गैस प्रावस्था पी.एच.व तापक्रम, कोशिका संवर्धन माध्यम तथा अनुपूरक, संतुलित लवण विलयन । सामान्य एवं वृद्धि संवर्धन माध्यम ।

REQUIREMENTS FOR CELL CULTURE-CULTURE ENVIRONMENT, SUBSTRATE, GAS PHASE, pH AND TEMPERATURE. BALANCED SALT SOLUTION. SIMPLE AND GROWTH CULTURE MEDIA.

इकाई की रूपरेखा

- 3.0 उद्देश्य
- 3.1 प्रस्तावना
- 3.2 संवर्धन वातावरण
 - 3.2.1 अधःस्तर
 - 3.2.2 गैस प्रावस्था
 - 3.2.3 पी.एच.
 - 3.2.4 तापक्रम
- 3.3 संत्रित लवण विलयन
- 3.4 संवर्धन माध्यम
 - 3.4.1 सामान्य एवं वृद्धि माध्यम
 - 3.4.2 अनुपूरक
- 3.5 सारांश
- 3.6 शब्दावली
- 3.7 सन्दर्भ ग्रंथ
- 3.8 बोध प्रश्न
- 3.9 अभ्यासार्थ प्रश्न

3.0 उद्देश्य:

इकाई दो में हम कोशिका संवर्धन का परिचय, कोशिका संवर्धन हेतु विभिन्न आवश्यकताएँ तथा प्रयोगशाला का प्रारुप आदि का अध्ययन कर चुके हैं। विभिन्न प्रयोगों में जब सम्पूर्ण जीव पर किसी पदार्थ के प्रभाव का अध्ययन करना उचित नहीं होता तो ऐसी परिस्थिति में उस जीव की कोशिकाओं को कृत्रिम संवर्धन माध्यम में जीवित रखकर उन पर प्रयोग किया जाता है जैसे किसी हानिकारक रसायन, रेडियोधर्मी पदार्थ या कैंसर पैदा करने वाले पदार्थ का यदि मनुष्य शरीर पर अध्ययन किया जाए तो व्यक्ति पर स्थाई हानिकारक प्रभाव पड़ सकते हैं परन्तु उस व्यक्ति की कोशिकाओं को संवर्धित कर उन पर ऐसे पदार्थों का अध्ययन किया जाए तो जीव पर पड़ने वाले हानिकारक प्रभाव को रोका जा सकता है । इन प्रयोगों में रसायन की मात्रा भी कम लगती है । इस इकाई में हम कोशिका संवर्धन की आवश्यकताओं विशेषकर संवर्धन वातावरण एवं संवर्धन माध्यम आदि का विस्तृत अध्ययन करेंगे ।

3.1 प्रस्तावनाः

बींसवी सदी के प्रारम्भ में प्राणी कोशिका संवर्धन हेतु पोषक माध्यम के रुप में रक्त प्लाज्मा, उतक एक्सट्रेक्ट, रक्त सीरम आदि प्रयोग में लिए जाते थे । इन प्राकृतिक रूप से उपलब्ध पदार्थों की जटिलता और विभिन्नता के कारण इनको संवर्धन माध्यम के रुप में उपयोग में लेने में कठिनाई उत्पन्न होती है । इसका हल निकालने के लिए कई वैज्ञानिकों ने विभिन्न प्रयास किए तथा यह पता लगाया कि कोशिकाओं के संवर्धन की क्या आवश्यकताएँ हैं तथा संवर्धन माध्यम में कौन-कौन से रसायन होने चाहिए ।

रासायनिकी निर्धारित कृत्रिम संवर्धन माध्यम की दिशा में प्रथम प्रयास लेविस, बेकर, केरेल वोगेलार एवं लिकमेन आदि ने किए । जब कृत्रिम संवर्धन माध्यम कोशिका की वृद्धि हेत् पूर्णरुपेण सम्पन्न साबित नहीं हुए तो इस क्षेत्र में कार्यरत वैज्ञानिकों ने संवर्धन माध्यम में विभिन्न प्रकार के अन्पूरकों (Supplements) का प्रयोग किया । केरेल की खोज (1912) से ज्ञात हु आ की भ्रूणीय ऊतक के सत् में वृद्धि बढाने वाले पदार्थ बहु तायत में पाये जाते है । केरेल और बेकर (1926) ने प्रतिपादित किया कि कुछ पेप्टोन, प्रोटिएस और दूसरे अपघटित उत्पाद जब सीरम और प्लाज्मा के साथ प्रयोग में लिये जाते है तो ये पदार्थ फाइब्रोब्लास्ट, एपीथीलियल कोशिकायें और रक्त मोनोसाईट्स आदि के संवर्धन के लिये अत्यन्त लाभकारी साबित हुए । इसी प्रकार बेगेलर और इरलिचमेन (1993) ने विकिरण दिए हुए, थीम प्लाज्मा, पेप्टोन, हेमिन सिस्टीन, इन्स्लिन थायरोक्सिन, ग्लूकोज और दूसरे अपघटित उत्पादों को संवर्धन हेत् सीरम या प्लाज्मा के साथ प्रयोग में लिया तो इन्होंने फाइब्रोब्लारट, एपीथीलियल कोशिका, और रक्त मोनोसाइट के लिये आवश्यक पोषक पदार्थ उपलब्ध कराये । फिशर का सप्लीमेन्ट्री माध्यम यू-614 डायलाइज्ड प्लाज्मा, डायलाइज्ड भ्रूण एक्सट्रेक्ट, टाइरोड का विलयन, ग्लूकोज, फ्रक्टोज डाईफोस्फेट ग्लूटेमीन, सिस्टीन, ग्लूटेथियोन, ट्रिप्टोफेन, फिनाइल एलेनाइल थ्रियोनाइन आइसोल्यूसीन, ल्यूसीन, वेलीन, आरजीनाइन, हिस्टीडीन और लाइसीन का बना होता है । इस प्रकार कोशिका संवर्धन क्षेत्र में विभिन्न प्रकार के संवर्धन माध्यम तथा अन्पूरकों का प्रयोग होने लगा ।फ्रेशने (2004) संवर्धन माध्यम के साथ यह भी आवश्यकता महस्स की गई कि कोशिकाएँ को जब संवर्धन माध्यम में जीवित रखा जाता है तथा यह वृद्धि करती है तो यह भी जानना अत्यन्त आवश्यक है कि उसके लिए किस प्रकार का अधःस्तर चाहिए तथा उनके चारों तरफ

गैसीय वातावरण कैसा हो तथा माध्यम का पी.एच कितना हो व कोशिकाओं को संवर्धन हेतु कितने तापक्रम पर रखा जाए । इस अध्याय में हम इन सभी आवश्यकताओं का अध्ययन करेंगे।

3.2 संवर्धन वातावरण :

3.2.1 अधः स्तर -अधिकतर सामान्य कोशिकाओं को फैलाव के लिये एक अधःस्तर की आवश्यकता होती है । अधिकतर कोशिकायें अपनी वृद्धि के लिये आलम्बन चाहती है । इस तरह की कोशिकाएँ अधःस्तर निर्भर कोशिकाएँ कहलाती है । अधिकांश कशेरूकी कोशिकायें जिन्हें कि संवर्धन माध्यम में रखा जाता है वे एक कृत्रिम अधःस्तर पर एकल स्तर के रूप में वृद्धि करती है । अतः अधःस्तर कोशिकाओं के जुड़ाव के लिये सही विधि से आवेशित होना चाहिए या आसंजन कारकों का जुड़ाव इस तरह से हो जिससे कोशिकाओं में फैलाव और जुड़ाव हो सके । अतः अधःस्तर सही विधि से आवेशित होना चाहिए ।

अधःस्तर की परिभाषा - यह कोई एक कार्बनिक या अकार्बनिक पदार्थ हो सकता है जो कि फैलाव, चिपकने और तीव्र वृद्धि/प्रजनन दोनों के लिये स्थान उपलब्ध कराता है । प्राणी कोशिका संवर्धन तकनीकी में अधःस्तर के रूप में विभिन्न प्रकार के पदार्थ काम में लिये जाते है जो कि निम्न है:-

कांच (Glass) - शीशा दर्पण अपने ऑप्टिकल गुणों और सतह के कारण वास्तविक अधःस्तर के रूप में काम में लिया जाता है । यह अपनी वृद्धि करने वाले गुणों को खोये बिना आसानी से धोया जा सकता है । इसे उच्च ताप द्वारा आसानी से कीटाणु रहित (निर्जमीकृत) किया जा सकता है तथा अच्छे गुणवता युक्त काँच का रिफ्रेक्टिव इन्डेक्स वायु माध्यम के समकक्ष होने के कारण इसके अंदर रखी रचनाओं को आसानी से देखा जा सकता हैं ।

फंकने योग्य प्लास्टिक (Disposable Plastics) - एक बार प्रयोग आने वाले पॉलीस्ट्रीन फ्लास्क संवर्धन के लिये एक सरल अधःस्तर उपलब्ध कराते हैं । ये अधिकतर प्लास्टिक की ऑप्टिकल गुणवता अच्छी होती है तथा यह चपटी सतह प्रदान करते हैं जिस पर की कोशिकाएं आसानी से चिपक जाती हैं तथा वृद्धि भी कर पाती हैं । पॉलीस्ट्रीन हाइड्रोफोबिक है और कोशिका वृद्धि के लिये सही सतह (स्थान) उपलब्ध नहीं कराता है । इसलिये कोशिका संवर्धन के उपयोग में लाया जाने वाला प्लास्टिक रासायनिक रूप से गामा विकिरणों से या विद्यूत विभव द्वारा उपचारित किया जाता है जिससे कि चिपकने वाली गीली सतह बन सके तथा जिस पर कोशिकाएं आसानी से वृद्धि कर सके । प्लास्टिक विभिन्न रासायनिक गुण संजोए रहते है । पोलीस्ट्रीन एक बहुत सुलभ /साधारण और सस्ता प्लास्टिक अधःस्तर है । कोशिकायें पॉलीविनाइल क्लोराइड (पीवीसी), पॉलीकार्बोनेट पॉलीटेट्राफ्लूरो इथाइलीन (पीटीएफई) मेलिनेक्स, थर्मोनोक्स और कई अन्य प्रकार के प्लास्टिकों पर भी सर्वार्धित की जा सकती है । प्लास्टिक की सतह को एक सामान्य ऋणात्मक आवेश दिया जाता है जिससे कि प्लास्टिक सतह पर धनात्मक आवेश वाली कोशिकार्ये चिपक सके ।

मेट्रिक्स लेपन -अधःस्तर को कई तरीकों से पूर्व उपचारित करके कोशिका आसंजन और वृद्धि को बेहतर बनाया जा सकता है । टीर्योनेक्टीन (मेट्रिक्स) व कोलेजन से अधःस्तर की सीडिंग करना । यह कोशिकाओं के चिपकने, वृद्धि और विभेदीकरण में मदद करती है । दो सतहों के बीच विद्यूत- आवेश एकान्तरण कोशिका अटेचमेंट और फैलाव करता है । ग्लाइको प्रोटीन और प्रोटियोग्लाईकन

का जिटल मिश्रण अधिकतर कोशिकाओं की सतह को घेरे रहता है। यह प्रत्येक उतक और उतक के किसी भाग के लिये अति विशिष्ट होता है। आर्जीनाइन, ग्लाइसीन, एस्पारिटक एसिड जो कि आधात्री अणुओं में पाये जाते हैं। ग्लाइकोप्रोटीन और प्रोटियोग्लाईकन के लिये ग्राही अणु होते हैं और ये कोशिकाओं के चिपकने और विरोधी आवेश उत्पन्न करने में मदद करते हैं। कई विभिन्न प्रकार के मेट्रिक्स उत्पाद व्यावसायिक स्तर पर उपलब्ध है जैसे कि कोलेजन चूहे की पूंछ का कोलेजन, कोन्ड्रोनेक्टिन जोकि कोन्ड्रोसाइट के चिपकने में मदद करता है। इन पदार्थों को मेट्रिक्स लेपन के लिए काम में लिया जा सकता है।

त्रिआयामी मेट्रिक्स- कोशिका संवर्धन के लिए द्विआयामी अधःस्तर संवर्धन एक आसान विधि है । इसमें कोशिकाएँ जीवित भी रहती हैं तथा अभिवृद्धि भी करती हैं परन्तु बार-बार द्विआयामी अधःस्तर पर संवर्धन करने से कोशिकाओं के कार्यिकी तथा आकारिकी गुण कम होने लगते हैं । इसमें कोशिका- मेट्रिक्स अन्तःक्रिया भी कम हो जाती है ।

ये सब अपूर्णतायें त्रिआयामी पदार्थों को अधःस्तर के रुप में लेने से पूरी हो जाती है जैसे कोलेजन जैल, सेल्यूलोस स्पंज अकेले या कोलेजन जैल से आच्छादित अधःस्तर रचनाएं। कोलेजन आच्छादित स्पंज में अधिकतर कोशिकायें सेल्यूलोस स्पन्ज के आंतरिक भागों में प्रवेश कर जाती हैं और त्रिआयामी संस्थायें बनाती हैं जैसे कि वेस्क्यूलर एन्डोथीलियम कोशिकाओं के संवर्धन में केपिलरी नलिकाओं का बनना।

सूक्ष्म केरियरस- पॉलीस्टरीन सेफाडेक्स तथा पॉलीएक्मीलेमाइड आदि पदार्थ अत्यन्त सुक्ष्म दानों के रुप में उपलब्ध होते हैं जोिक अपने चारों तरफ कोशिकाओं को चिपकने व वृद्धि करने देते हैं । सूक्ष्म केरियर पर एक स्तरी कोशिकायें संवर्धित करने से संवर्धन की सतह और माध्यम के आयतन का अधिकतम अनुपात प्राप्त हो जाता है जो कि बीड के आकार और घनत्व पर निर्भर करता है । इसका एक और लाभ है कि कोशिकायें निलम्बन की तरह व्यवहार कर सकती है ।

विकल्पी कृत्रिम अधःस्तर- लगभग 90 प्रतिशत स्थितियों में काँच या प्लास्टिक को अधःस्तर के रूप में प्रयोग में लाया जाता है परन्तु कई बार स्टेनलेस स्टील को भी अधःस्तर के रूप में प्रयोग में लाया जाता है उदाहरणार्थ कुछ रेडियोधर्मी पदार्थों के अध्ययन के लिए स्टेनलेस स्टील अधोःस्तर को काम में लिया जाता है।

3.2.2 गैस प्रावस्था- गैस प्रावस्था संवर्धन माध्यम में कार्बनडाई ऑक्साईड और ऑक्सीजन के संतुलन को परिभाषित करती है क्योंकि कार्बन डाईआक्साइड की उपस्थिति संवर्धन माध्यम में माध्यम के पी.एच. को प्रभावित करती हैं।

ऑक्सीजन - विभिन्न संवर्धन परिस्थितियों के लिए ऑक्सीजन की अलग-अलग आवश्यकता होती है । उदाहरणार्थ भ्रूण कोशिकाओं को संवर्धन हेतु अधिक ऑक्सीजन की आवश्यकता होती है परन्तु कुछ कैंसर कोशिकाएँ जैसे मनुष्य के फेफडों की फाइब्रोब्लास्ट कोशिकाएँ कम ऑक्सीजन युक्त वातावरण में अधिक वृद्धि करती हैं । अधिकतर कोशिकाओं को श्वसन के लिये इन वीवो तंत्र में ऑक्सीजन की आवश्यकता पड़ती है पर सवंधित कोशिकायें ग्लाइकोलाइसिस पर निर्भर करती है । अधिकांश संवर्धन योग्य कोशिकाओं को माध्यम में घुलनशील ऑक्सीजन की आवश्यकता होती है । लेकिन माध्यम में घुलनशील ऑक्सीजन की सांद्रता व मुक्त ऑक्सीजन का स्तर बढा होने के कारण विषैला प्रभाव डालती है । माध्यम में सही वातावरणीय टेन्शन स्थापित करने के लिये ऑक्सीजन केरियर जैसे हीमोग्लोबिन और ऑक्सीजन स्केवेन्जर जैसे 2-

मरकेप्टो इथेनोल मिलाते हैं । कोशिका संवर्धन को कम वातावरणीय टेन्शन की आवश्यकता होती है । ऑक्सीजन परासरण, पोरस माइक्रोकेरियरस में सीमाकारी हो सकता है । माध्यम की गहराई दो से पांच मि.मी की रेन्ज में स्थिर रखना उचित होता है क्योंकि सवंधित माध्यम की गहराई ऑक्सीजन विसरण की दर को प्रभावित करती है ।

कार्बन डाइ आक्साइड- कार्बन डाईआक्साइड कोशिका संवर्धन में अधिक महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है क्योंकि यह जल के साथ मिलकर कार्बोनिक अम्ल बनाती है जोकि संवर्धन माध्यम के पी.एच को कम कर देता है।

बाईकार्बोनेट बफिरेंग प्रबंध तंत्र द्वारा कार्बोनिक अम्ल के मात्रा का नियंत्रण किया जाता है । इसिलए एक निश्चित मात्रा में बाइकार्बोनेट तथा 1 N NaOH द्वारा 36.5 डिग्री तापक्रम पर संवर्धन करते हुए पीएच की मात्रा नियंत्रित की जाती है । इसी प्रकार 20 mM HEPES बफर द्वारा संवर्धन माध्यम का पी.एच नियंत्रित किया जाता है । माध्यम में उपस्थित सोडियम कार्बोनेट की मात्रा के आधार पर संवर्धन पात्र में आवश्यक मात्रा में कार्बन डाई आक्साइड प्रसारित की जाती है ।

संवर्धन माध्यम में सही पी. एच. बनाये रखने के लिये घुलनशील कार्बनडाई आक्साइड की जरूरत होती है । संवर्धन माध्यम में कार्बन डाईआक्साइड, गैस प्रावस्था में घुलनशील कार्बन डाई आक्साइड के रूप में होती है तथा यह साम्यावस्था में कार्बोनिक अम्ल बनाती है साथ ही पी. एच. कम कर देती है । वातावरणीय कार्बन डाई आक्साइड तनाव घुलनशील कार्बन डाई आक्साइड की सांद्रता नियंत्रित करता है । वातावरणीय कार्बन डाई आक्साइड बढने का अंतिम नेट परिणाम पी. एच. कम करना है । बढ़ी हुई कार्बन डाई आक्साइड सांद्रता का असर को कम करने के लिए बाई कार्बोनेट की सांद्रता को बढ़ाकर इसे उदासीन कर दिया जाता है । बाइकार्बोनेट (H2CO3) की बढी हुई सांद्रता माध्यम में एक संतुलन बनाये रखती है जिसकी वजह से अनुकूलतम कार्यिकीय पी.एच. बना रहता है । सही पी. एच. और ओसमोलेरिटी प्राप्त करने के लिये प्रत्येक संवर्धन माध्यम का एक निश्चित बाईकार्बोनेट सांद्रता और कार्बनडाई आक्साइड टेन्शन होता है ।

3.2.3 पी.एच-.एच. विलयन में हाइड्रोजन आयन का ऋणात्मक लोगेरिथमं है । पी. एच. श्वसन और प्रोटीन संश्लेषण जैसी कई प्रकार की उपापचयी क्रियाओं में मुख्य भूमिका निभाता है । । एन्जाइमों की सहायता से शरीर के अन्दर की प्रत्येक उपापचयी क्रियाओं में पी. एच. मदद करता है । अधिकतर कोशिकायें 7.4 पी. एच. पर वृद्धि करती है क्योंकि यह पी. एच. ही कोशिका द्रव्य के अन्दर पाया जाता है । कोशिका संवर्धन के लिये एक निश्चित पी. एच. बनाये रखना आवश्यक होता है क्योंकि यदि एक निश्चित पी. एच. नहीं बनाये रखा गया तो एन्जाइमों की सहायता से होने वाली सभी जैव रासायनिक क्रियायें रूक जायेगी और कोशिका की मृत्यु हो जायेगी ।

3.2.4 तापक्रम- कोशिका संवर्धन के लिये अनुकूलतम ताप इस पर निर्भर करता है कि किस जीव से कोशिका प्राप्त की गई है तथा उसका शारीरिक तापक्रम क्या है ।

उपरोक्त कारणों से अधिकतर मनुष्यों और उष्ण रक्तधारी प्राणियों की कोशिका लाइन के लिये 37°C ताप योग्य माना गया है । पिक्षयों में उच्च शारीरिक ताप के कारण अनुकूलतम वृद्धि के लिये पिक्षी कोशिकार्ये 38°C पर संवर्धित की जाती है । प्रत्येक प्राणी में उसकी प्राकृतिक वृद्धि, शारीरिक क्रिया कलापों एवं सभी शारीरिक फिजियोलोजिक कार्यों के लिये एक निश्चित ताप

आवश्यक होता है जिसे अनुकूलतम ताप कहते हैं । जब कोशिकाओं की वृद्धि प्रयोगशाला में की जाती है तो अनुकूलतम ताप का ज्ञान होना आवश्यक है क्योंकि इसी ताप पर कोशिका के फिजियोलोजिकल कार्य अधिकतम सम्पन्न होते हैं । अतः संवर्धन तापक्रम कोशिका की वृद्धि में एक महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है ।

कोशिका का सहनशील ताप :- किसी कोशिका की ताप की अधिकतम और न्यूनतम सीमा का भी अच्छी तरह ज्ञान होना चाहिए क्योंकि अनुकूलतम ताप की एक सीमा होती है जिस सीमा तक कार्यिकीय क्रियायें ठीक प्रकार से कार्य करती है लेकिन उस सीमा के बाहर कार्यिकीय क्रियायें रुक जाती है । एन्जाइम सभी कार्यिकीय क्रियाओं में मुख्य भूमिका निभाते हैं । प्रत्येक एन्जाइम एक निश्चित ताप पर कार्य करता है । सवंधित कोशिकायें 4°C ताप पर कई दिनों तक जीवित रह सकती है और ये- 196°C तक ठंडी करके जमाई जा सकती है ।

ताप की अनुकूलता, या स्थिरता पर ध्यान देना पुन: प्राप्त करने योग्य परिणामों को निश्चित करने के लिये आवश्यक है । आवश्यकता से अधिक समय के लिये इनक्यूबेटर और गर्म कमरे के दरवाजे खुले नहीं छोड़ने चाहिए । इनक्यूबेटर में ताप वितरण समान होना चाहिए ।

3.3 सन्तुलित लवण विलयन (BSS):

संतुलित लवण विलयन सभी आवश्यक पोषक पदार्थी (कार्बनिक व अकार्बनिक लवण, अमीनो अम्ल विटामिनों) का द्रव्य के रूप में मिश्रण होता है । सन्तुलित लवण विलयन में बाईकार्बोनेट कार्बोनेट होते है जो कि बफर की तरह कार्य करते है और कार्यिकीय पी. एच. को सन्तुलित रखने में मदद करते है । ये विलयन परासरण, तन्यता, विस्कोसिटी, ऑक्सीजन, कार्बन डाई आक्साइड सन्तुलन बनाये रखने में सही भूमिका निभाते हैं ।कार्बोनेट बाइकार्बोनेट, कार्बनिक और अकार्बनिक लवणों की उपस्थिति आवश्यकतानुसार फिजियोलोजिकल पी.एच. बनाये रखने में मदद करती है । संवर्धन प्लेट से कार्बन डाई आक्साइड के बाहर निकलने से पी.एच. बढ जाता है । संवर्धन माध्यम में एक बफरिंग पदार्थ की आवश्यकता पी.एच. को नियत करने के लिये होती है । सन्तुलित लवण विलयन कई प्रकार के संवर्धन माध्यमों हेतु विलायक का कार्य भी करता है । इसे कभी - कभी उतक विच्छेदन व कोशिकाओं को धोने के काम में भी लिया जाता है । यह एक आइसोटोनिक लवण विलयन की तरह कार्य करता है।

Earle के संतुलित लवण विलयन में निम्न पदार्थ एक निश्चित मात्रा में पाए जाते हैं ।

रसायन	मात्रा gm/l
Cacl₂ (Anhydrous)	0.02
КСІ	0.04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
NaCl	6.68
NaHCO₃	2.20
NaH₂PO₄.H₂O	0.14
D-Glucose	1.00
Phenol Red	0.01

3.4 संवर्धन माध्यमः

जिटल पोषक पदार्थों का मिश्रण जिसमें कार्बनिक, अकार्बनिक पदार्थ सन्तुलित मात्रा में हो जो कि प्रयोगशाला में इन विट्रो अवस्था में कोशिका के वृद्धि और गुणन के लिये आवश्यक हो ।

माध्यम में उपस्थित पदार्थी की प्रकृति के आधार पर ये निम्न वर्गी में विभाजित किये जाते हैं-

- (1) प्राकृतिक रूप में उपलब्ध माध्यम
- (2) रासायनिक परिभाषित माध्यम

प्राकृतिक उपलब्ध माध्यम - इस प्रकार का माध्यम जैविक स्त्रोतों जैसे मुर्गी के भ्रूण का स्त्राव या रस एल्ब्यूमिन, सीरम प्लाज्मा इत्यादि है । कोशिका संवर्धन से संबंधित जब वैज्ञानिकों ने प्रारम्भ में अध्ययन शुरु किया तो कोशिकाओं को सीधे ही प्राकृतिक उपलब्ध माध्यमों में संवर्धित किया जाता था जैसे कि मुर्गी के भ्रूण का स्त्राव एल्ब्यूमिन, सीरम, प्लाज्मा इत्यादि । परन्तु इन प्राकृतिक संवर्धन माध्यमों की निश्चित मात्राओं की जानकारी के अभाव में तथा ऐसे माध्यमों के निर्जमीकरण कठिनाइयों के ध्यानान्तिगत धीरे-धीरे कृत्रिम परिभाषित माध्यमों का विकास हुआ जोकि पाउडर के रुप में बाजार में उपलब्ध होने लगे जिन्हें व्यवसायिक रासायनिक परिभाषित माध्यम के रुप में जाना जाने लगा ।

व्यवसायिक रासायनिक परिभाषित माध्यम- इस प्रकार के माध्यम में अकार्बनिक पदार्थ जैसे एमिनो अम्ल, विटामिन, वृद्धि कारक, एन्टीबायोटिक आदि निश्चित मात्रा में डाले जाते है । ये सब प्रायः पाउडर (महीन चूर्ण) के रूप में उपस्थित होते है । इसमें विशिष्ट मात्रा के संवर्धन माध्यम पाउडर में निश्चित मात्रा का आसुत जल मिलाया जाता है तथा इससे बनने वाला विलयन संवर्धन माध्यम कहलाता है ।

3.4.1 सामान्य एवं वृद्धि माध्यम -वे रासायनिक परिभाषित माध्यम जोकि कोशिकाओं को जीवित रखने में तो सक्षम होते हैं परन्तु उनमें कोशिका जननकारी या वृद्धिकारी क्षमताएं नहीं होती है उन्हें सामान्य माध्यम कहते हैं । परन्तु कुछ अनुपूरकों के द्वारा सामान्य परिभाषित माध्यमों की कोशिका जननकारी क्षमताओं में वृद्धि की जा सकती है ऐसे संवर्धन माध्यमों को वृद्धि माध्यम कहते हैं । निम्न वर्णन संवर्धन माध्यमों के मुख्य घटकों तथा उनके कार्यों से संबंधित है । संवर्धन माध्यम के मुख्य (अंशों) घटकों के कार्य-अमीनो अम्ल और विटामिनः ये आवश्यक पोषक पदार्थ स्तनधारी कोशिकाओं की वृद्धि और विभाजन के लिये जरूरी होते हैं । आवश्यक अमीनो अम्ल सिस्टीन और लायसीन ग्लूटेमाइन के साथ सर्वर्धित कोशिकाओं के लिये आवश्यक होते है । विटामिन - विटामिन स्तनधारी कोशिका की वृद्धि और विभेदन के लिये आवश्यक होते है । बायोटीन, पी-अमीनो बेन्जोइक अम्ल, कोलीन, फोलिक अम्ल, आइनोशियल निकोटीनामाइड, विटामिन ए, डी, ई और के आवश्यक विटामिन स्तनधारी कोशिकाओं की वृद्धि और गुणन के लिये उपयोगी होते है ।

लवण- माध्यम में लवण कोशिका की परासरण सान्द्रता बनाये रखने के लिये मिलाये जाते है । Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , So_4^{-2} , PO_4^{-3} और HCO_3^- मुख्य लवण है जो कि माध्यम में मिलाये जाते है । Ca^{+2} केल्शियम संकेतक ट्रान्सडक्शन में मध्यस्थ का कार्य करता है । Na^+K^+ और Cl^- कला विभव को निर्धारित करते है, जबिक SO_4^{-2} , PO_4^{-3} और HCO_3^- मेट्रिक्स के लिए आवश्यक रसायन होते है ।

ग्ल्कोज - यह अधिकांश माध्यमों में ऊर्जा स्त्रोत की तरह प्रयुक्त होता है । यह मुख्यतः उपापचय द्वारा ग्लाइकोलाइसिस की क्रिया में पाईरुवेट में परिवर्तित हो जाता है । पाईरुवेट, लेक्टेट या एसीटोएसीटेट में परिवर्तित होकर सीट्रिक एसिड चक्र मैं प्रवेश कर कार्बन डाई आक्साइड बनाता है ।

लिपिड्स - लिनोलिक अम्ल, ओलिक अम्ल, इथेनोलेमिन और केथेनोलेनाइन थोडी मात्रा में माध्यम में डाले जाते है ।

व्यवसायिक स्तर पर विभिन्न संवर्धन माध्यम उपलब्ध हैं जैसे MEM, DMEM, F-12, M199 इत्यादि ।

MEM (Minimum Essential Medium) के निम्न घटक हैं ।

Amino acids

- L arginine
- L cysteine
- L-glutamine
- L-histidine
- L-isoleucine
- L-leucine
- L-lysine HCL

L-methionine

L-phenylalanine

L-threonine

L-trptophan

Vitamins

L-tyrosine

L-valine

Choline chloride

Folic acid

Myo-inositol

Nicotinamide

D-Ca Pentothenate

Pyridoxal HCL

Riboflavin

Thiamin

Inorganic salts

CaCl₂

KCL

 $MgSO_4$

NaCl

NaHCO₃

NaH₂PO₄

Energy metabolism

D-Glucose

pH indicator

Phenol red

- 3.4.2 अनुपूरक -अधिकांश संवर्धन माध्यम पूरी तरह से रासायनिक घटकों के बने होते हैं तथा इन घटकों के द्वारा कोशिकाएँ जीवित तो रहती है परन्तु कोशिकाओं के जनन व विभेदन के लिए कुछ बाहय अनुपूरकों का उपयोग करना आवश्यक हो जाता हैं। जैसे कि मुर्गी के बच्चे से प्राप्त रक्त प्लाज्मा प्राणी कोशिका संवर्धन में प्रयुक्त होता है क्योंकि यह एक साफ सुथरा ठोस कोगुलेशन बनता है साथ ही प्लाज्मा पूरा पोषण भी देता है जिसमें कोशिकाएँ विस्तृत समय के लिये आसानी से जीवित रह सकती है और गुणन भी कर सकती है। रक्त प्लाज्मा के विभिन्न महत्व निम्न है:-
- (1) विभिन्न प्रकार के संवर्धनों के लिये पोषक आधार और पोषणयुक्त आकार उपलब्ध कराना ।

- (2) कोशिकाओं के अच्छी तरह चिपकने के लिये काँच के आधार की स्थिति को बनाना ।
- (3) कोशिका के चारों और स्थानीय माध्यम की अवस्था का कोष्ठ बनाना ।

प्लाज्मा पूर्ण रक्त के अपकेन्द्रीकरण से प्राप्त होता है । रक्त में कोई भी थक्का विरोधी कारक नहीं डाला जाता है । ऊतक प्लाज्मा की थोड़ी मात्रा में रख दिया जाता है और थक्का जमने कीं क्रिया को थ्रोम्बिन या कुछ मात्रा में ऊतक सत् डालकर प्रेरित किया जाता है जिससे की एक ठोस आधार बनता है । कोशिकाओं को संवर्धन में लगातार वृद्धि और क्रियाशीलता के लिये ठोस आधार की आवश्यकता होती है ।

रक्त सीरम- रक्त सीरम का प्रयोग दूसरे पोषक पदार्थी के साथ किया जाता है । रक्त सीरम कोशिका जनन को बढाने में मदद करते हैं, आसंजन कारक कोशिकाओं को चिपकने में बढ़ावा देते हैं । सीरम में लिपिड, हारमोन, मिनरल और कई पदार्थ जो प्रोटीन के बने रहते हैं, पाए जाते हैं । प्राणी कोशिका संवर्धन में प्रयुक्त रक्त सीरम काफ - बोवीन व फीटल - बोवीन है । रक्त सीरम में विभिन्न प्रोटीन जैसे एज्यूमिन, फाइब्रोनेक्टीन और $\propto -2$ मेक्रोग्लोब्यूलिन होते हैं जो कोशिका के चिपकने और कोशिका वृद्धि में मदद करते हैं । प्रोटीन पदार्थ माध्यम की विस्कोसिटी को बढाते हैं ।

सीरमयुक्त माध्यम- संवर्धन माध्यम में सीरम का उपयोग सामान्य नहीं है क्योंकि इसकी कुछ हानियाँ भी हैं। यदि एक से अधिक प्रकार की प्राणी कोशिकायें संवर्धन के लिये प्रयुक्त होती है तो प्रत्येक निश्चित कोशिका को विभिन्न प्रकार के सीरमों की आवश्यकता होती है जिससे कई संवर्धन समूह एक साथ चलाने पडते है। जबकोशिका संवर्धन डाउन स्ट्रीमिंग विधि द्वारा कोशिका उत्पाद वापस प्राप्त करने के लिये प्रयुक्त होता है तो शद्धीकरण में सीरम की उपस्थित बाधा उत्पन्न करती है। सीरम कभी-कभी अनुचित वृद्धि को भी प्रेरित कर सकता है और कुछ अवस्थाओं में तो यह वृद्धि रोक भी सकता है।

उत्तक सत् (Extract) - केरेल ने खोजा कि मुर्गी के भ्रूण के हृदय से लिये संयोजी उत्तक में कोशिका वृद्धि और गुणन को बढाने की अद्भुत क्षमता होती है । यह पाया गया है कि प्रोटियेज और उच्च आणविक भार के प्रोटीन विखंडन उत्पादों में भी वृद्धि बढ़ाने की प्रबल क्षमता रखते है। वृद्धि बढ़ाने की क्रिया उन टुकड़ों से जुड़ी होती है जो राइबो न्यूक्लिक अस्त से जुड़े प्रोटीन अणु होते हैं । जोकि प्रभावी न्यूक्लियो प्रोटीन होते है ।

मुर्गी के भ्रूण का सत् - मुर्गी के भ्रूण का सत्, दस से ग्यारह दिन के भ्रूण से बनाया जाता है । अंडे से भ्रूण को निकालकर मोटर से चलने वाले होमोजिनाइजर से पीस लिया जाता है । होमो जिनाइजेशन के बाद इसको अपकेन्द्रीकृत करके दस से बीस गुना पतला किया जाता है तथा सबंधित कृत्रित रासायनिक संवर्धन माध्यम में इसे अनुपूरक के रुप में प्रयोग में लाया जाता है । यीस्ट एक्सट्रेक्ट माध्यम के साथ अनुपूरक सीरम - मनुष्य की विभिन्न कोशिका रेखा तथा कई अन्य जन्तु प्रजातियों की कोशिका रेखा के लिए यीस्ट एक्सट्रेक्ट माध्यम के साथ अनुपूरक सीरम एक वृद्धिकारक का कार्य करता है । यह माध्यम निम्न से मिलकर बना होता है- यीस्ट एक्सट्रेक्ट माध्यम, मनुष्य का सीरम. सीरम सप्लीमेन्टेड लेक्टएसल्ब्यूमिन हाइड्रोलाइसेट आदि । इस माध्यम में मनुष्य की विभिन्न कोशिका रेखा और दूसरी जातियों के कोशिका प्रकार पूर्ण रुप से वृद्धि करती है ।

3.5 सांराश

कोशिका संवर्धन के लिए जो पोषक माध्यम लिया जाता है उसमें उचित मात्रा में पोषक पदार्थ, हार्मोन व विटामिन होने चाहिए । पोषक माध्यम प्राकृतिक या कृत्रिम रूप से तैयार किया जाता है । कोशिका संवर्धन को कोशिका घनत्व, सीरम कारक, कैल्शियम आयन, कोशिका कोशिका और कोशिका आधात्री अंतिकया अधःस्तर, गैस प्रावस्था, पी.एच आदि कारक प्रभावित करतें है । संवर्धन माध्यम मे विटामिन्स, लवण, ग्लुकोज, वृद्धि कारक हार्मोन, लिपिड्स प्रतिजैविक आदि उपस्थित होते है । प्राणी कोशिका संवर्धन के लिए रक्त प्लाज्मा, रक्त सीरम, उतक अर्क, संतुलित लवण विलयन आदि आवश्यक होते है ।

3.6 शब्दावली :

- 1. पी.एच. :- हाइडो्जन आयन सांद्रता का ऋणात्मक लघुगुणक ।
- 2. माध्यम:- जटिल पोषक पदार्थी का मिश्रण जिसमें कार्बनिक, अकार्बनिक पदार्थ संतुलित मात्रा में हो जो कि प्रयोगशाला में इन विटो् अवस्था में कोशिका के वषद्वि एंव गुणन के लिए आवश्यक है।

3.7 सन्दर्भ ग्रन्थ:

कल्चर ऑफ एनिमल सेल्स-आर.इआन.फ्रेशने-विल्ली- लिस

J	ठ.ठ बाध प्ररन:	
1.	कोशिका संवर्धन के लिए आवश्यक अधिकतम तापमान	होना
	चाहिए ।	
2.	माध्यम में लवण कोशिका की को बनाए रखने के लिए मिलाये	जाते
	है ।	
बहु	विकल्पी प्रश्न	
1.	कला विभव को नियंत्रित किया जाता है:-	
	अ. Ca ⁺²	

	स. Cl ⁻	द. उपरोक्त सभी
संक्षिप्त	प्रश्न :	
1. अध	ाःस्तर समझाइए ।	
उत्तर:		
2. पी.	एच. का कोशिका संवर्धन प	ार क्या प्रभाव होता है । समझाइए ।
उत्तर:-		

3.9 अभ्यासार्थ प्रश्न: -

- 1. कोशिका संवर्धन में काम आने वाले विभिन्न अधःस्तर का वर्णन करो ।
- 2. संतुलित लवण विलयन को समझाइये।
- 3. परिभाषित रासायनिक संवर्धन माध्यम के मुख्य घटकों का विस्तार से वर्णन कीजिए।

कोशिका संवर्धन तकनीकियाँ।उपकरणों व संवर्धन माध्यम का निर्जर्मी करण। निर्जर्मीकरण यंत्र, ऊतकों का असमुहन एंव प्राथमिक संवर्धन । लेमीनार वायु प्रवाह, प्रकार व अनुप्रयोग। CELL CULTURE TECHNIQUES, STERILIZATION OF EQUIPMENTS AND MEDIA. AUTOCLAVES. DIS-AGGREGATION OF TISSUES AND PRIMARY CULTURE. LAMINAR AIR FLOW, TYPES AND APPLICATIONS.

इकाई की रूपरेखा

- 4.0 उद्देश्य
- 4.1 प्रस्तावना
- 4.2 उपकरणों व सवंर्धन माध्यम का निर्जर्मीकरण
- 4.3 निर्जर्मीकरण
- 4.4 अतकों क्य अपसमूहन एवं प्राथमिक संवर्धन
- 4.5 लेमीनार वाय् प्रवाह, प्रकार एवं अन्प्रयोग
- 4.6 सारांश
- 4.7 शब्दावली
- 4.8 संदर्भ ग्रंथ
- 4.9 बोध प्रश्न
- 4.10 अभ्यासार्थ प्रश्न

4.0 उद्देश्य:

इस इकाई में कोशिका संवर्धन की तकनीकों के बारे में जानकारी प्राप्त करना तथा विभिन्न उपकरणों तथ्य संवर्धन माध्यम के निर्जर्मीकरण की जानकारी प्राप्त करना है साथ ही प्राथमिक संवर्धन लेमिनार वायु प्रवाह यंत्र के बारे में भी आवश्यक जानकारी प्राप्त करना है।

4.1 प्रस्तावना :

कोशिका संवर्धन किसी भी अंग के ऊतक से प्राप्त कोशिकाओं को संवर्धित माध्यम में रखकर पुन: जीवित व गुणित करने को कहते हैं ।ये कोशिकाएँ संवर्धन माध्यम में लगभग सभी उपापचयी कियाएँ करती हैं । माध्यम में गुणनकारी कारक (Multiplying factor) व विभेदनकारी कारक (Differentiation factor) उपस्थित हों तो कोशिकाएँ जनन व विभेदन भी करती हैं। इस प्रकार से परिभाषित रसायनिक माध्यम में अनुपूरकों की उपस्थिति में वृद्धि कर रही कोशिकाओं को विभिन्न अध्ययनों में उपयोग में लिया जा सकता है जैसे कि किसी हारमोन के प्रभाव का कोशिकाओं पर अध्ययन करना हो तो संवर्धन माध्यम में उस हारमोन की एक निश्चित मात्रा मिलाने के पश्चात् कोशिकाओं में आकारिकीय व जैव रासायनिक परिवर्तनों का अध्ययन किया जा सकता है। इस अध्याय में कोशिका संवर्धन से सबंधित तकनीकियों तथा उपकरणों, संवर्धन माध्यम का निर्जमीकरण व ऊतकों का असमुहन और लेमीनार वायु प्रवाह व उसके प्रकार के बारे में अध्ययन करेंगे।

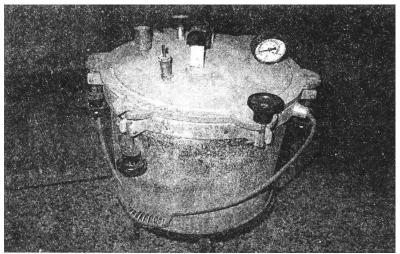
4.2 उपकरणों एवं सर्वर्धन माध्यम का निर्जमीकरण :

निर्जर्मीकरण से अभिप्राय है वस्तु को जीवाणु संदूषण रहित बनाना । कोशिका संवर्धन में शीशे, प्लास्टिक व धातु से बने उपकरण, संवर्धन माध्यम आदि उपयोग में आते हैं । हर वस्तु का निर्जर्मीकरण इस पर निर्भर करता है कि वह किस पदार्थ की बनी हुई है । धातु की वस्तुएं सूखी ऊष्मा से अच्छी तरह निर्जर्मीकृत हो जाती है जबिक सिलीकॉन, रबर, पोलीकार्बोनेट, सेल्यूलोज फिल्टर्स 121 डिग्री सेन्टीग्रेड तापक्रम पर पर बीस मिनिट के लिये रखने पर और सौ किलोपास्कल (100 kPa) या एक दशमलव एक किलो ग्राम प्रति वर्ग सें.मी (1.1 Kg/cm²) या पंद्रह पाँउण्ड प्रति वर्ग इंच (15lb/inch²) वायुदाब पर उपकरण ऑटोक्लेव किए जाते है । निर्जर्मीकरण विधि केवल सूक्ष्मजीवों को नष्ट करने के लिए नहीं होती है परन्तु अधिक प्रतिरोधी बीजाणुओं को हटाने के लिए भी प्रयुक्त की जाती है ।

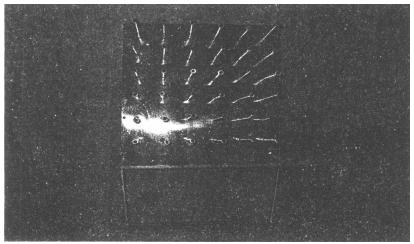
नम ऊष्मा, संवर्धन माध्यम के ऊष्मा संवेदी पदार्थों के सूक्ष्म जीवों को मारने/ नष्ट करने में प्रभावशाली होती है। नम ऊष्मा के असरकारक होने के लिए ऊष्मा के भेदनकारी क्षमता का पहले पता लगाया जाता है। कुछ पदार्थ जो ऊष्मा संवेदी होते है उन्हें ऑटोक्लेविंग या सूखे ऊष्मा निर्जर्मीकरण के लिये ताप के सामने खुला नहीं छोडा जा सकता है। इस तरह के पदार्थों को निर्जर्मीकृत करने के लिये उनको तीस मिनिट के लिये सत्तर प्रतिशत एल्कोहल में डुबोते हैं तत्पश्चात इन्हें निर्जर्मीकृत वातावरण में पराबैंगनी प्रकाश के नीचे सुखाते है।

अॉटोक्लेव व ऑटोक्लेविंग- ऑटोक्लेव- ऑटोक्लेव एक प्रेशर क्कर की तरह का उपकरण होता है जिसमें एक निश्चित मात्रा में पानी भरकर और तेज ऊष्मा द्वारा पानी को वाष्पित किया जाता है । वाष्प में उपस्थित गुप्त ऊष्मा इस उपकरण के न केवल अत्याधिक गर्मी पैदा करती है परन्तु अत्याधिक वायुदाब भी पैदा करती है । इसके ढक्कन पर ऊष्मा व दाब मापी यंत्र उपस्थित होता है चित्र संख्या 4.2 में छोटे आकार के ऑटोक्लेव को दर्शाया गया है। चूंकि ऑटोक्लेव में अत्याधिक वायुदाब होता है अतः इसकी दीवारें मजबूत धातु की बनी होती है । जिन उपकरणों आदि को ऑटोक्लेविंग किया जाता है, में सर्वप्रथम डिटरजेंट की सहायता से धो लिया जाता है तत्पश्चात् उन्हें सुखाकर कागज द्वारा लपेट लिया जाता है और धागे से कागज को कसकर बाँध दिया जाता है ।इस प्रकार उपकरण ऑटोक्लेविंग के लिए तैयार हो जाते है । ऑटोक्लेव के तल में स्थित तिपाई स्टेंड पर इन उपकरणों को रख दिया जाता है तथा ऑटोक्लेव में पानी इतना भरा जाता है कि उसका स्तर तिपाई स्टेंड कि प्लेट के नीचे रहे। इसके बाद ऑटोक्लेव के ढक्कन को बंद कर चालू किया जाता है। लगभग 121 डिग्री सेन्टीग्रेड तापक्रम पर बीस मिनिट के लिए रखने

पर और सौ किलोपास्कल (100 kPa) या एक दशमलव एक ग्राम प्रति वर्ग सें.मी (1.1 Kg/cm²) या पंद्रह पाँउण्ड प्रति वर्ग इंच (15 lb/inch²) वायुदाब पर उपकरण ऑटोक्लेव किए जाते है।



चित्र 4.2 ऑटोक्लेव



चित्र 4.3 ग्लॉस वेयर ड्रायर

4.3 निर्जर्मीकरण:

कांच के उपकरणों का निर्जर्मीकरण - माध्यम के संग्रहण और कोशिकाओं के संवर्धन के लिये प्रयुक्त होने वाले कांच के उपकरणों की अच्छी तरह सफाई करनी चाहिए । यदि कोशिका गमन के लिये कांच की सतह प्रयुक्त होती है तो यह इस तरह साफ होनी चाहिए कि ये आवेशित रहे ।

कांच के उपकंरणों को धोने के लिये एक अच्छा डिसइन्फेक्टेंट होना चाहिए । संक्रामक दोष नाशक जैसे हाइपोक्लोराईट (तीन सौ पी. पी. एम. क्लोरीन में उपलब्ध) एक अच्छा डिसइन्फेक्टेंट है । इसके पश्चात् कांच के उपकरणों को एक घंटे के लिये ओवन में एक सौ साठ डिग्री सेन्टीग्रेड पर रखा जाता है । संवर्धन वैसल डिसइन्फेक्टेन्ट से साफ करके ओवन में सुखाकर 121 डिग्री सेन्टीग्रेड पर बीस मिनिट के लिये ऑटोक्लेव करना चाहिए । ऑटोक्लेविंग के समय

बोतलों को चूडीदार ढक्कन से ढीला बन्द करके एल्यूमिनियम फोइल या कागज से लपेट कर ऑटोक्लेव टेप से लपेट देना चाहिए । पिपेट वाशर में अच्छे डिजरजेंट से पिपेट को साफ करके सूखी ऊष्मा निर्जर्मीकरण के लिये ओवन में रखना चाहिए । कुछ कॉच के उपकरणों को शुष्क गर्म वायु से भी सुखाया जाता है । चित्र संख्या 4.3 में दर्शायी गई स्टील की नलियों से शुष्क गर्म वायु प्रवाहित होती है जिससे की कॉच के छोटे उपकरण शीघ्र सूख जाते है ।

पानी माध्यम और रिएजेन्ट का निर्जर्मीकरण-

पानी का निर्जर्मीकरण - ऊतक संवर्धन में प्रयोग आने वाला पानी अत्यधिक शुद्ध होना चाहिए । पानी के शुद्धिकरण के लिए निम्न चार अवस्थाएँ है-

- (1) रिवर्स ओसमोसिस व डिस्टीलेशन (2) काबर्न फिल्ट्रेशन
- (3) डिआयोनाइजेशन (4) स्क्ष्मदर्शी फिल्ट्रेशन अल्ट्राप्योर पानी के लिये पहली अवस्था डिस्टीलेशन यूनिट के साथ रिवर्स ओसमोसिस है । रिवर्स ओसमोसिस की सहायता से पानी लवणों, स्क्ष्म जीवाणुओं और बीजाणुओं से मुक्त हो जाता हैं । यह शुद्ध पानी जल डिस्टीलेशन यूनिट से ग्जारा जाता है तब यह ऊष्ण निर्जर्मीकृत पानी देता है।

दूसरी अवस्था कार्बन फिल्ट्रेशन है जो कि दोनों कार्बनिक और अकार्बनिक कोलॉइडस को हटाती है । तीसरी अवस्था उच्च ग्रेड मिश्रित डिआयोनाइजेशन आयनीकृत पदार्थ हटाने की है और अन्तिम अवस्था सूक्ष्मदर्शी फिल्ट्रेशन सूक्ष्मजीवाणुओं को हटाने की है । अल्ट्रोप्योर अआयनीकृत पानी जो माध्यम और अभिकर्मकों की तैयारी के काम में लिया जाता है उसे भी 121 डिग्री सेन्टीग्रेड और एक बार (दाब यूनिट) पर 20 मिनट के लिये ऑटोक्लेव करना चाहिए ।

माध्यम और रिएजेन्ट का निर्जर्मीकरण - वे माध्यम जो ऊष्मा संवेदी होते हैं या जिसमें ऑटोक्लेविंग के बाद अवक्षेपण होता है इनको छनित्र (Filter) के द्वारा निर्जर्मीकृत किया जाता है । इन छनित्रों में 0.1 से 0.2 म्यू. एम (माइक्रोमीटर) के माइक्रोपोरस फिल्टर होते हैं । अधिकांश माइक्रोपोर फिल्टर पालीईथर सल्फोन के बने होते हैं । (पी.ई.एस) पोलीईथर सल्फोन परिशुद्ध फिल्टर होते हैं जिनमें क्रम से समान पोरोसिटी के छिद्र होते हैं जो कि बहाव दर, को एक समान रखते हैं।

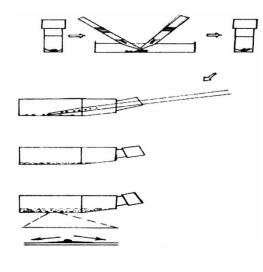
डिस्पोजेबल फिल्टर्स - विभिन्न क्षमता और अभिविन्यास के डिस्पोजेबल फिल्टरों के सिरिंज की अलग-अलग आवश्यकता होती है । कम आयतन के फिल्ट्रेशन (2-20 मिलि) के लिये साधारणतया सिरिंज टिप फिल्टर प्रयुक्त होता है और जो आकार में 13-50 मि मी. तक व्यास के होते हैं । मध्यम आकार के फिल्टर (50-500 मि ली के लिये) पेरिस्टेल्टिक फिल्टरों के साथ लाइन में प्रयुक्त हो सकते है ।

4.4 ऊतकों का अपसमूहन एवं प्राथमिक संवर्धनः

जिस ऊतक स्त्रोत से कोशिकाएँ प्राप्त की जाती हैं उस ऊतक में कोशिकाएँ विभिन्न बंधों से बंधी होती है जैसे गेप जंक्शन, टाइट जंक्शन तथा अंतर कोशिकीय आधात्र आदि । कोशिकाओं को ऊतक से अपसमुहित करने के लिए विभिन्न विधियाँ प्रयोग में लाई जाती है । कोशिकाओं के बंधन विभिन्न बंधनकारी अणुओं की मध्यस्थता के कारण होते हैं इन्हें एडेहसन अणु कहते है । उनमें से कुछ केल्शियम पर निर्भर होते है और चिलेटिंग एजेन्ट जैसे इ.डी.टी.ए के प्रति संवेदी

होते है । एन्टरग्रिन्स पदार्थ जो कि आर.जी.डी मोटिफ के साथ बादय कोशिकीय मेट्रिक्स में बंधे रहते है । यह प्रोटिएज संवेदी होते है और हाइल्यूरोनीडेज या प्रोटिएज एन्जाइम के द्वारा विखंडित होकर कोशिकाओं को बंधन मुक्त कर देते है तथा ऊतक का छोटे-छोटे टुकडों में दूटना शुरु हो जाता है ।

चित्र 4.4 ऊतकों का अपसमूहन



अ. स्केलपल या ब्लेड द्वारा BSS माध्यम में छोटे-छोटे टुकडों में काट कर अपकेन्दीकरण करना।

ब. पिपेट द्वारा निलम्बित कोशिकाओं को संवर्धन पात्र में डालना तथा पात्र का ढक्कन बंद करना।

स. संवर्धन के पश्चात् कवर क्लिप पर कोशिकाओं को अभिरंजित कर अवलोकन करना ।

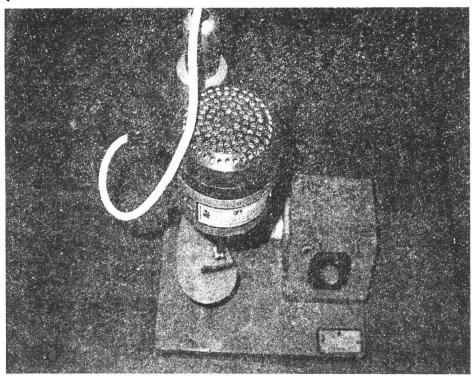
ऊतकों का अपसमूहन दो विधियों द्वारा किया जाता है।

- 1. एन्जाइम विधि
- 2. यांत्रिक अपसम्रहन
- (1) **एन्जाइम द्वारा अपसमूहन** अलग किया गया ऊतक कुछ एन्जाइमों जैसे ट्रिप्सीन, कोलेजिनेज, डेस्टेज, हाइल्यूरोनीडेज, डीएनएज आदि एन्जाइम अकेले या साथ साथ प्रयुक्त होते है । क्रूड ट्रिप्सीन (एक प्रकार का प्रोटिएज) केल्शियम की उपस्थिति में पेप्टाइड बन्ध से एमीनोग्रुप हटा देता है और इसके कारण ग्लाइकोपेप्टाइड को बांधने वाले पेप्टाइड दूट जाते है । इसका लंबा एक्सपोजर रहने पर ग्लाइकोपेप्टाइड से पेप्टाइड समूह हटाये जा सकते हैं और अन्तत: ऊतकों का कोशिका निलम्बन में अपसमूहन हो सकता है ।

कोलेजिनेज या इलेस्टेज - संयोजी ऊतक और मासंपेशियों के ऊतकों के बाहय कोशिकीय मेट्रिक्स में कोलेजन बाइन्डिंग प्रोटीन की तरह कार्य करता है । कोलेजन संयोजी ऊतक और पेशीऊतक की विभिन्न कोशिकाओं के लिये बाइन्डिंग साइट का कार्य करके एक मुख्य भूमिका निभाता है । कोलेजिनेज कोलेजन प्रोटीन में रिसाव उत्पन्न करता है जिससे संयोजी ऊतक और पेशी ऊतक की विभिन्न कोशिकाओं की बाइन्डिंग साइटस टूट जाती है तथा वे अलग हो जाती है ।

हाइल्यूरोनीडेज - कुछ भ्रूणीय ऊतक के अन्तः कोशिकीय मेट्रिक्स और बेसमेन्ट मैम्ब्रेन में प्रोटियोग्लाइकन जैसे इन्टीग्रिन्स लेमीनिन्स होते हैं । ये प्रोटियोग्लाइकन जैसे इन्टीग्रिन्स, ऊतकों में कोशिका से कोशिका चिपकाने वाले अणुओं का कार्य करते है । हाइल्यूरोनीडेज के कारण प्रोटियोग्लाइकनम से कार्बोहाइडेट का प्रेसिपीटेशन होता है ।

- (2) यांत्रिक अपसमूहन एन्जाइमों द्वारा अपसमूहन एक बहुत ही कष्टप्रद या कष्टसाध्य कार्य है और एन्जाइमेटिक अपसमूहन में कोशिकाओं के नष्ट होने की संभावना रहती है । बहुत से लोग यांत्रिक अपसमूहन की विधि काम में लेते हैं । विभिन्न प्रकार यांत्रिक अपसमूहन के निम्न पद है (चित्र 4.4)
- (अ) सर्वप्रथम ऊतक को सावधानी से ब्लेड की सहायता से पतला काटा जाता है उस समय बाहर गिरने वाली कोशिकाओं को इकट्ठा कर लिया जाता है तथा अपकेन्द्रीकरण द्वारा ऊतकों के बडे ट्रकडों को अलग कर दिया जाता है।
- (ब) कभी-कभी विच्छेदन किए हुए उत्तक को एक के बाद एक श्रेणियों में लगी चलनियों से दबा कर चलनी के छिद्र दवारा कोशिकाओं को अलग करने के पश्चात् अपकेन्द्रीकरण किया जाता है।
- (स) बड़े ऊतकों को ऊतक होमोजिनाइजर यंत्र की सहायता से छोटे-छोटे टुकडों में काट लिया जाता है । अतक होमोजिनाइजर एक विधुत उपकरण है जिसमें एक ब्लेड युक्त रॉड होती है जिसके चक्रण से अतक के छितरे-छितरे हो जाते है । इस उपकरण को चित्र 4.5 में दर्शाया गया है ।
- (द) अपकेन्द्रीकरण के पश्चात् निलम्बित कोशिकाओं को संवर्धन पात्र में स्थानान्तरित कर दिया जाता है ।



चित्र 4.5 ऊतक होमोजिनाइजर

प्राथमिक कोशिका संवर्धन - पहले ऊतक को ऊतक होमोजिनाइजर ब्लेड या एन्जाइम की सहायता से पृथक किया जाता है तत्पश्चात् अपकेन्द्रीकरण द्वारा कोशिका निलम्बन बनाते है जिसे कि बाद में ठोस अधःस्तर पर चिपकने वाले एकल स्तर के रूप में सवर्धित किया जाता है । इसमें तीन प्रमुख पद हैं -

(I) ऊतकों का अपसम्हन

- (II) अपसम्हित कोशिकाओं का निलम्बन व संवर्धन पात्र में स्थानान्तर
- (III) संवर्धन पात्र की आतरिक सतह पर कोशिकाओं का एकल स्तर तथा स्वच्छ संवर्धन माध्यम द्वारा फीडिंग

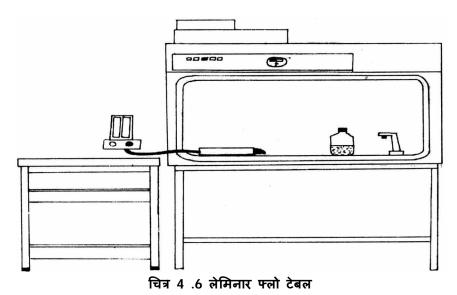
प्राथमिक कोशिका संवर्धन के समय आवश्यक सावधानियाँ -

- (1) विच्छेदन के समय वसा और नेक्रोटिक ऊतक को हटा दिया जाना चाहिए ।
- (2) ऊतक को तेज धार वाले औजार से महीन काटा जाए जिससे कम से कम नुकसान हो ।
- (3) अपसमूहन के लिये प्रयुक्ता एन्जाइमों को सावधानी पूर्वक अपकेन्द्रिकरण अथवा क्रमिक तनुकरण द्वारा हटा दिया जाना चाहिए ।
- (4) प्राथमिक कोशिका संवर्धन के लिए भ्रूणीय ऊतक अधिक उत्तम होता है क्योंकि यह अधिक तेजी से असमुहित होता है तथा अधिक जीवित कोशिकायें प्रदान करता है और प्राथमिक कोशिका संवर्धन में अधिक तेजी से गुणन करता है।
- (5) कोशिकाओं की वृद्धि दर मापन के पश्चात् निश्चित समयाविध पर ताजा संवर्धन माध्यम् से फीडिंग करनी चाहिए । कोशिकाओं की गणना हीमोसाइटोमीटर से की जाती है ।कोशिका संवर्धन माध्यम को प्लेटिंग के आठ से सोलह घंटे बाद बदल देना चाहिए ।
- (6) संवर्धन माध्यम में कभी कभी डी.एन.एज. भी काम में लिया जाता है क्योंकि मृत कोशिकायें क्रोमेटिन उत्पन्न करती है और ट्रिप्सीन विलयन की प्रोटीएज अभिक्रिया डीएनए से जुडे प्रोटीनों को नष्ट कर देती है।
- (7) अपसमूहन की वृद्धि (उन्नित) व गुणवतग् सूक्ष्मदर्शी की सहायता से समय समय पर देखी जानी चाहिए ।

4.5 लेमिनार वायु प्रवाह, प्रकार एवं अनुप्रयोग :

लेमिनार वायु प्रवाह - जब एक निश्चित क्षेत्र की पूरी वायु एक दिशा में वेग से समानान्तर बहाव रेखा में प्रवाहित हो तो उसे लेमीनार वायु प्रवाह कहते है तथा इस कार्य को करने वाले उपकरण को लेमिनार वायु प्रवाह क्लीन बैंच या लेमीनार फ्लो टेबल भी कहते हैं।

केमीनार फ्लो टेबल - लेमीनार फ्लो टेबल एक ऐसी मशीन है जिसमें स्वयं की फिल्डरड वायु प्रवाहित होती है जो कि. कीटाणु रहित वातावरण बनाने में मदद करता है तथा यह दूषित होने से बचाता है, । बैन्व पर जो आगे का कार्य चल रहा है वह एच ई पी ए फिल्डरड वायु से कुला हुआ है यह निश्चित करता है कि कीटाणु रहित वायु हुड से कार्य स्थल के अन्दर से बाहर की ओर बहती है । कीटाणु रहित वायु का वेग 0.4 मीटर प्रति सेकेण्ड नियत किया जाता है । लेमीनार फ्लो बेन्व के कार्य सतह का परिमाप सामान्यत चार फीट चौड़ा और दो फीट गहरा होता है ।



लेमिनार वाय् प्रवाह बैंच के प्रकार- लेमिनार वाय् प्रवाह बैंच दो प्रकार के होते हैं

- (1) क्षेतिज लेमिनार वायु प्रवाह बैंच
- (2) उर्ध्व लेमिनार वायु प्रवाह बैंच
- (1) क्षेतिज लेमिनार वायु प्रवाह बैंच- इस लेमिनार वायु प्रवाह बैंच में वायु का प्रवाह अंदर से बाहर की ओर बैंच के समानान्तर अध्ययनकर्ता की ओर प्रवाहित होती है तथा इस वायु का पुनग्वक्रण नहीं होता । क्षेतिज वायु प्रवाह में वायु का प्रवाह रिथर होता है तथा निर्जर्मीकृत संवर्धन माध्यम और अभिकर्मकों के बचाव के लिए अधिक उपयुका होता है ।
- (2) उर्ध्व लेमिनार वायु प्रवाह बैंच- इस उर्ध्व लेमिनार वायु प्रवाह बैंच में वायु का प्रवाह हुड के छत से नीचे कार्यक्षेत्र की ओर होता है । इसमें वायु का पुनचक्रण होता है । यह लेमिनार वायु प्रवाह अध्ययनकर्ता की सुरक्षा के लिए अधिक उपयुक्त है ।

फिल्टर शीटों की प्लेटिंग - फिल्टर शीटों की चार-पांच सतह एक के ऊपर एक होती है जो कि फिल्टर की सतह का क्षेत्रफल बढाती है । प्लेटिंग एत्थूमिनियम बेफल्म द्वारा अलग अलग होती है । जो कि हवा को फिल्टर के आर पार ले जाता है । एच. ई. पी. ए. 0.3 माइक्रोन से छोटे पार्टीकूलेटस को फंसा सकता है या ट्रेप कर सकता है । वाष्प या गैस हीपा (एच इ पी ए) फिल्टर के दवारा नहीं सोखी जा सकती है ।

एयर कर्टन - एयर कर्टेन दरवाजे की पूरी चौडाई में आर पार तेज गति की जेट हवा उत्पन्न करता है ।अधिक गति की एयर जेट गर्म क्षेत्र और ठंडे क्षेत्र को अलग करती है । यह धूल मिट्टी और दूसरे प्रदूषण करने वाले पदार्थों को आन्तरिक बचाव क्षेत्र में घ्सने से रोकता है ।

एयर शावर- यह युक्ति दरवाजे के फ्रेम पर चिपकी रहती है और छनी हुई हवा देती है । एयर फ्लो लगभग पांच हजार फिट प्रति मिनिट होता है और हीपा (एच. ई. पी. ए) फिल्डरस के आरपार बनता है ।

लेमीनार एयर फ्लो बैंच की कार्य विधि -एक लेमीनार एयर फ्लो बैंच में हवा एक धोने योग्य पुन:चक्रण युक्त फिल्टर के द्वारा हुड के आधार के अन्दर ब्लोअर से खींची जाती है और फिर हीपा (एच. ई. पी. ए) फिल्टर के दवारा हुड तक ऊपर धकेली जाती है । फिल्डरड हवा कार्य सतह के आर-पार सौ एफ. पी. एम. के स्थिर वेग से अध्ययनकर्ता की तरफ आती है। लेमीनार फ्लो क्लीन बैंच में वायु आयतन और वेग के एकदम सही नियंत्रण से वायु की गुणवत्ता बनाए रखी जा सकती है।

4.6 सांराश :

कोशिका संवर्धन किसी भी अंग के ऊतक से प्राप्त कोशिकाओं को संवर्धित माध्यम में रखकर पुनः जीवित व गुणित करने को कहते हैं । निर्जमीकरण से अभिप्राय है वस्तु को जीवाणु संदूषण रहित बनाना कोशिका संवर्धन में शीशे, प्लास्टिक व धातु से बने उपकरण, संवर्धन माध्यम कार्य में आते हैं । हर वस्तु का निर्जमीकरण इस पर निर्भर करता है कि वह किस पदार्थ की बनी हुई है । ऑटोक्लेव एक प्रेशर कुकर की तरह का उपकरण होता है जिसमें एक निश्चित मात्रा में पानी भरकर और तेज ऊष्मा द्वारा पानी को वाष्पित किया जाता हं । वाष्प में उपरिथत गुपा ऊष्मा इस उपकरण के न केवल अत्याधिक गर्मी पैदा करती है परन्तु अत्याधिक वायुदाब भी पैदा करती है । जिस ऊतक स्त्रोत से कोशिकाएँ प्राप्त की जाती हैं उस ऊतक में कोशिकाएँ विभिन्न बंधों से बधी होतीं है जैसे गेप जंक्शन, टाइट जमान तथा अंतर कोशिकीय आधात्र आदि । कोशिकाओं को ऊतक से अपसमुहित करने के लिए विभिन्न विधियाँ प्रयोग में लाई जाती है । उत्तकों का अपसमूहन दो विधियों द्वारा किया जाता है

- 1. एन्ताइम विधि
- 2. यांत्रिक अपसमूहन

प्राथमिक कोशिका संवर्धन - पहले ऊतक को ऊतक होमोजिनाइजर ब्लेड या एन्जाइम की सहायता से पृथक किया जाता है तत्पश्चात् अपकेन्द्रीकरण द्वारा कोशिका निलम्बन बनाते है जो कि बाद में ठोस अधःस्तर पर चिपकने वाले एकल स्तर के रूप में सवर्धित किया जाता है।

लेमिनार वायु प्रवाह-जब एक् निश्चित क्षेत्र की पूरी वायु एक दिशा में वेग से समानान्तर बहाव रेखा में प्रवाहित हो तो उसे लेमीनार वायु प्रवाह कहते है तथा इस कार्य को करने वाले उपकरण को लेमिनार वायु प्रवाह क्लीन बैंच या लेमीनार फ्लो टेबल भी कहते हैं

लेमिनार वाय् प्रवाह बैंच के प्रकार- लेमिनार वाय् प्रवाह बैंच दो प्रकार के होते हैं

- (1) क्षेतिज लेमिनार वायु प्रवाह बैंच
- (2) उर्ध्व लेमिनार वायु प्रवाह बैंच

4.7 शब्दावली:

- 1. कोनकेविटी स्लाइड :- एक विशिष्ट गडडेदार स्लाइड जिसकी सहायता से जीवित कोशिका संवर्धन का अध्ययन किया जाता है ।
- 2. लेमिनार वायु प्रवाह :- एक निश्चित क्षेत्र से पूरी वायु एक दिशा से समानान्तर प्रवाह रेखा में वायु प्रवाह करने वाला उपकरण ।

4.8 संदर्भ ग्रंथ:

डि रोबरटिस, अलबर्ट, कूपर

4.	9 बोध प्रश्न :
1.	प्राथमिक कोशिका संवर्धन में कोशिकाएँ पात्र के से चिपकी रहती है।
2.	प्रयोगशाला में संवर्धन में किया जाता है ।
1.	बहु विकल्पी प्रश्न
1.	ऊतक संवर्धन के लिए अत्याधिक शुद्ध पानी प्राप्त करने की विधि है -
	अ. आसवन ब. विआयनीकरण
	स. रिवर्स परासरण द. उपरोक्त सभी
2.	संक्षिप्त प्रश्न
1.	निर्जर्मीकरण क्या है?
376	तरः
2.	डिस्पोजेबल फिल्टर्स क्या है?

4.10 अभ्यास प्रश्न :

- 1. प्राथमिक एक्सप्लांट संवर्धन क्या है । समझाइये?
- 2. ऊतकों का अपसमूहन क्या है । समझाइये?
- 3. लेमिनार वायु प्रवाह की कार्य विधि को समझाइये?

इकाई- 5

विभेदन व अद्यो-विभेदन की संकल्पनाएँ । कोशिका का संवर्धन माध्यम में विभेदन, विभेदन को प्रभावित करने वाले कारक । विभेदन के चिन्हक । वृद्धि गीतकी एवं वृद्धि वक्र । CONCEPT OF DIFFERENTIATION AND DEDIFFERENTATION OF CELL IN CULTURE. FACTORS AFECTING DIFFERENTATION, MARKRT OF DIFFERENTIATION, GROWTH KINETICS AND GEOWTH CURVES.

डकाई की रूपरेखा

- 5.0 उद्देश्य
- 5.1 प्रस्तावना
- 5.2 विभेदन की अवस्था
- 5.3 विभेदन की विशेषताएं
- 5.4 विभेदन के चरण
- 5.5 विभेदन की क्रियाविधि
- 5.6 विभेदन का नियंत्रण
- 5.7 अद्यो-विभेदन
- 5.8 विभेदन को प्रभावित करने वाले कारक
- 5.9 विभेदन के मार्कर
- 5.10 वृद्धि गतिकी
- 5.11 वृद्धि वक्र
- 5.12 सारांश
- 5.13 शब्दावली
- 5.14 सन्दर्भ ग्रन्थ
- 5.15 बोध प्रश्न
- 5.16 अभ्यासार्थ प्रश्न

5.0 **उद्देश्य**:

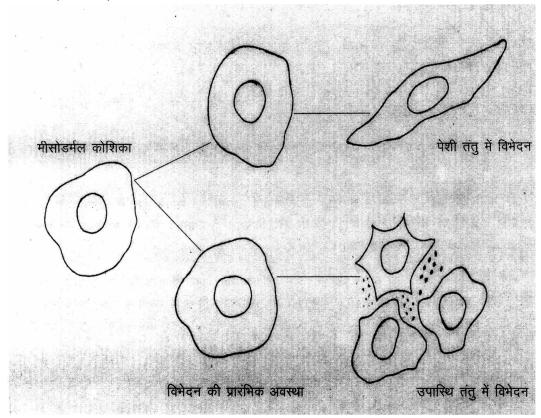
इस इकाई का उद्देश्य कोशिका संवर्धन के पश्चात् संवर्धन माध्यम में विभेदनकारी कारकों को अनुपूरकों के रुप में प्रयोग करने के पश्चात् कोशिकाओं में विभेदन का अध्ययन करना है। विभेदन के मार्कर जिसकी सहायता से विभेदन के स्तर किये जाते हैं।

5.1 प्रस्तावना :

विभेदन से अभिप्राय है कोशिकाओं का कोशिका चक्र से बाहर आकर कुछ विशिष्टता अर्जित करना जिससे कि वे अपनी पूर्ववर्ती अवस्था से भिन्न दिखाई दें । उदाहरणार्थ मीसोडर्मल कोशिकाएँ जब कोशिका चक्र सम्पूर्ण कर लेती हैं तो उनमें विभेदन करने वाली जीन की अभिव्यिका प्रारंभ हो जाती है । वे मीसोडर्मल कोशिकाएँ जो मॉरन पेशियाँ बनाती है उनमें एक्टिन व मायोसीन बनाने वाली जीन अभिव्यिक्त प्रारंभ हो जाती है तथा मीसोडर्मल कोशिका लम्बवत वृद्धि कर एक पेशी तंतु का निर्माण करती है इसी प्रकार मीसोडर्म कोशिकाओं में कोन्ड्रीन नामक प्रोटीन के निर्माण के पश्चात् उपास्थि कोशिका का निर्माण होता है । मीसोडर्म से पेशी तंतु या उपास्थि कोशिका का बनना आदि विकासीय प्रक्रियाओं को विभेदन कहते हैं । इस इकाई में हम कोशिका विभेदन से संबंधित विभिन्न बिन्दुओं का अध्ययन करेंगे तथा यह समझेंगे कि :-

- (i) शरीर में विभेदन प्रक्रिया किस प्रकार पूर्ण की जाती है जिससे विभिन्न कोशिकाओं का निर्माण होता है।
- (ii) विभेदन की क्रिया -विधि क्या है?
- (iii) विभेदन की सम्पूर्ण प्रक्रिया को नियंत्रण करने वाले कारक कौन कौन से है ?
- (iv) अद्यो-विभेदन प्रक्रिया की जीव शरीर के लिए क्या उपयोगिता है तथा यह कैसे नियंत्रित होती है?
- (v) विभेदन के मार्कर तथा वृद्धि गतिकी क्या है ?
- (vi) वृद्धि वक्र तथा इसकी विभिन्न अवस्थाओं का विभेदन में क्या महत्व है? जब विभेदित कोशिकाओं को किसी पात्र में (इन-विट्रो) संवर्धित किया जाता है तो इनके लक्षण-

गुण आदि परिवर्तित हो जाते है तथा इन कोशिकाओं के लक्षण इनके उत्पत्ति स्त्रोत की कोशिकाओं से पूर्णतया अलग हो जाते है। यह रुपान्तरण अनेक कारकों के द्वारा होता है। इन कारकों द्वारा कोशिकाओं की कार्यिकीय प्रणाली तथा ज्यामिति विन्यास को नियंत्रित किया जाता है अर्थात विभेदन एक विशेष प्रकार की जीन द्वारा नियंत्रित प्रक्रिया है जिसमें कार्यिकीय रूप से परिपक्व कोशिका संवर्धन माध्यम में लक्षण समाहित होने के कारण पूर्व रूप



चित्र 5.1 कोशिका विभेदन

- (i) अनुत्क्रमणीयता (Reversibility) अनुत्क्रमणीयता से तात्पर्य है कि अग्रेषित परिवर्धन का पुनः पूर्ववर्ती अवस्था में नहीं होना । भ्रूणीय विकास के समय कोई भी परिवर्धन की अग्रेषित अवस्था पुनः अपनी पूर्वावस्था में परिवर्तित नहीं हो पाती है, जैसे ग्रेस्टुला अवस्था कभी भी मोरुला में रूपान्तरित नहीं होती है । यह विभेदन की एक महत्वपूर्ण विशेषता है ।
- (ii) जीन नियंत्रित प्रक्रिया (Gene Controlled Process) विभेदन की प्रक्रिया एक निश्चित जीन कार्यक्रम द्वारा नियंत्रित होती है । आपको यह जानकारी पहले ही उपलब्ध कराई जा चुकी है कि कोशिकाओं में स्थित केन्द्रक विभिन्न जैविक क्रियाओं का नियंत्रण करता है ।परिवर्धन के समय प्रत्येक कोशिका में एक निश्चित प्रोग्राम निहित होता है कि किस जीन की अभिव्यक्ति किस कोशिका में किस समय होनी चाहिए । उदाहरणार्थ मीसोडर्म कोशिकाओं का पेशी कोशिकाओं में जब परिवर्तन होता है तो पेशी प्रोटीन संबंधित जीन अभिव्यक्ति होती है भले ही उन कोशिकाओं में उपास्थि बनाने वाले जीन भी मौजूद हो । इससे यह प्रतीत होता है कि प्रत्येक कोशिका विभेदन एक निश्चित जीन नियंत्रित उपक्रम के अनुसार चलता है ।

5.4 विभेदन के चरण:

विभेदन के निम्न प्रमुख पद हैं :-

- (i) जीन विभेदन कोशिका विभेदन वास्तव में जीन अभिव्यक्ति में विभेदन के साथ ही प्रारम्भ हो जाता है जो कि नवीनतम बनने वाले संदेशवाहक आर.एन.ए के रुप में दिखाई देता है।
- (ii) रासायनिक परिवर्तन रासायनिक विभेदन सामान्यतः संदेशवाहक आर.एन.ए के कोशिका द्रव्य में आने के पश्चात् प्रोटीन संश्लेषण प्रक्रिया से प्रारंभ हो जाती है तथा इसे सूक्ष्मदर्शी द्वारा नहीं देखा जा सकता तथा इनका नियंत्रण प्रत्यक्ष रूप से जीन द्वारा होता है । इस प्रकार के विभेदन के पश्चात् कोशिका का रासायनिक संगठन बदल जाता है ।
- (iii) कार्यिकीय विभेदन प्रारम्भ में सभी भ्रूणीय कोशिकाएं लगभग एक समान होती है लेकिन परिवर्तन के साथ-साथ ये कोशिका विशिष्ट कार्यों को करने के लिए विभेदित हो जाती हैं जिससे कोशिका की आकृति उसकी कार्यिकी के अनुरूप परिवर्तित होती है।
- (iv) आकारिकी विभेदन इस प्रकार के विभेदन में कोशिका की आकृति परिवर्तित हो जाती है जिसके कारण कोशिका एक दूसरे से अथवा अपनी पूर्व आकृति से पूर्ण रूपेण भिन्न हो जाती है उदाहरणार्थ उपकला कोशिकाओं में पक्ष्माभिकाएं, पेशीय कोशिकाओं में मायोफाइब्रिल की उपस्थित इनके विभेदित प्रतिरूप को प्रदर्शित करती है।
- (v) **कोशिकीय विभेदन:** वह प्रक्रिया जिसमें कोशिका अपनी आकृति व कार्य सम्पादन हेतु विशिष्ट हो जाती है । कोशिकीय विभेदन कहलाता है ।

5.5 विभेदन की क्रियाविधि:

किसी भी कोशिका को विभेदित होने से पहले कई प्रावस्थाओं से गुजरना पड़ता है। सर्वप्रथम कोशिकाएँ पूर्वनियोजित कार्यक्रम के अनुसार निश्चित संख्या के कोशिका चक्र संपन्न करती हैं। विभेदन से पहले कोशिकाओं की सामर्थ्य का ज्ञात होना आवश्यक है ताकि प्रेरण के प्रति अनुक्रिया दिखा सके। इसके पश्चात् इसमें निर्धारण की क्रिया होती है व अंत में एक विशिष्ट पथ में विभेदित हो जाती है।प्रायोगिक तौर पर जीनोपस में पाया गया है कि डी एन ए पर में अनुलेखन के समय न्यूक्लिओसोमल इकाईयां स्वतंत्र होती है क्योंकि संयोजी डी एन ए पर स्थित H1 हिस्टोन प्रोटीन हट जाती है। इस प्रकार गुणसूत्र प्रत्यक्ष रूप से कोशिकाद्रव्य के सम्पर्क में आ जाता है।

वेडिंग्टन ने बताया कि कोशिकाओं में विभेदन के समय समयबद्ध सामर्थ्य, था को सामान्य रूप से विभेदित करने में सहायक होता है। यदि परिवर्तित आ सभी प्रकार के प्रेरणों के प्रति अपना सामर्थ्य दर्शाये तो विभेदन अपूर्ण होगा व विकृत संतित निर्मित होती है।

5.6 विभेदन का नियंत्रण :

विभेदन सामान्यतया जीन द्वारा नियंत्रित होता है तथा अनुलेखन के पश्चात संदेशवाहक आर.एन.ए का निर्माण होता है जो कि अनुलेखन के पश्चात् कोशिका द्रव्य में विभिन्न नई-नई प्रोटीन व प्रोटीन उत्पादों के रूप में दिखाई देते है । जीनोम स्तर पर विभेदन के नियंत्रण का अध्ययन अनुलेखन स्तर पर तथा अनुवादन स्तर पर किया जाता है ।

जीनोम स्तर पर विभेदन का नियंत्रण - जीनोम स्तर पर होने वाले नियंत्रण निम्न है:

इंटरफेज में उपस्थित हीटरो क्रोमेटिन संभवतया जीन नियंत्रण में भाग लेता है । हिटेरोक्रोमेटिन में यूक्रोमेटिन की तुलना में डी एन ए की मात्रा अधिक पाई जोती है । यह अनुलेखन व अनुवादन में भाग लेता है ।

(i) अनुलेखन स्तर पर विभेदन का नियंत्रण - हिस्टोन गुणस्त्रीय प्रोटीन होते है जिसमें क्षारीय एमीनों अम्ल पाए जाते है । डी एन ए पर फास्फोरिक अम्ल के स्वतंत्र कार्बोक्सिलिक समूह उपस्थित होते है । वे कार्बोक्सिलिक समूह हिरटोन NH_2^+ समूहों के साथ बंध जाते है । इस संयोजन के कारण हिस्टोन प्रोटीन डी एन ए को आर एन ए पॉलीमरेज ट्राइफास्फोराइबोप्यूरीन आदि के साथ क्रिया करने से रोकता है ।

हिरटोन का अनुलेखन में नियंत्रण संभवतया हार्मीन्स प्रेरक, फास्फोरिलीकरण, एसीटिलीकरण तथा मिथाइलीकरण से डी एन ए हिस्टोन सम्बन्ध परिवर्तित हो जाने के कारण होता है इस प्रकार जीनोम से अनुलेखन का नियंत्रण होता है।

- (ii) अनुवादन स्तर पर विभेदन का नियंत्रण :- डी.एन.ए में उपस्थित आनुवांशिक सूचनाओं को प्रोटीन तक स्थानान्तरित करने के लिए निम्न नियंत्रण प्रक्रम उपस्थित होता है:-
- (i) एम-आर.एन.ए. का केन्द्रक में निर्माण
- (ii) एम-आर.एन.ए. का केन्द्रक से कोशिकाद्रव्य में स्थानान्तरण
- (iii) एम-आर.एन.ए. का राइबोसोम से बंधन
- (iv) राइबोसोम का सक्रियण अथवा निष्क्रियण
- (v) नवजात प्रोटीन का निर्माण तथा पश्चः अनुवादन (Post Translational) नियंत्रण
- (vi) प्रोटीन का विभिन्न कारकों में परिवर्तन

इसके अनुसार विभिन्न प्रकार के कारक जैसे हार्मीन, एम-आर.एन.ए. के केन्द्रक से कोशिकाद्रव्य में स्थानान्तरण राइबोसोम के साथ एम-आर.एन.ए. का बंधन तथा अनुवादन द्वारा प्रोटीन का संश्लेषण आदि को नियंत्रित करता है

5.7 अदयोविभेदन (De-Differentiation) :

कोशिका संवर्धन के समय प्रायः यह देखा गया है कि कोशिका जो कि मूल ऊतक से अलग की गई है तो उसमें लक्षणरुपी गुणों (Phenotypic Characteristics) का धीरे धीरे हास हो जाता है । इस प्रभाव को वैज्ञानिकों ने अद्योविभेदन कहा जो कि विभेदन के विपरित क्रिया मानी जाती है । परन्तु कुछ वैज्ञानिकों का यह भी मानना है कि यह मुख्य रूप से विभेदित कोशिकाओं के मध्य उपस्थित अविभेदित कोशिकाओं के गुणन के कारण होता है । विशेष सीरम युक्त संवर्धन माध्यम की सहायता से विशेष कोशिकाओं को अलग किया जा सकता है तथा इनको उपयुक्त परिस्थितियों में उपसंवर्धन किया जा सकता है जो कि आगे चलकर अलग अलग विभेदित कोशिकाओं के समूह के रूप में विकसित हो जाती है । हम अद्योविभेदन का अर्थ भलीभांति समझ चुके है कि किसी विभेदित कोशिका के लक्षण रूपी गुणों में क्षरण द्वारा तुलनात्मक अविभेदित कोशिका में रुपान्तरण । यह एक जटिल प्रक्रिया है जो कि कई सहायक कारकों जैसे कोशिका मृत्यु विशेष अतिवृद्धि तथा अनुकूल अनुक्रिया आदि से प्रभावित होता है । पुनरुद्धभवन के समय अद्योविभेदन एक महत्वपूर्ण चरण है ।

5.8 विभेदन को प्रभावित करने वाले कारक:

विभेदन प्रक्रिया एक अत्यन्त नियमितनियत्रित व जिटल प्रकिया है वे सभी कारक जो कि अनुक्रमण व अनुलेखन को प्रभावित करते हैं वे विभेदन क्रिया को भी प्रभावित करते हैं । इसके अलावा वे कारक जो कि डी.एन.ए मिथाइलेशन की क्रिया को प्रभावित करते हैं वे भी विभेदन को प्रभावित करते हैं कोशिका संवर्धन माध्यम में इन्सुलिन, फाइब्रोब्लास्ट ग्रोथ फेक्टर, था ऊतक सत् आदि अनुप्रकों के रुप में प्रयोग में लेने से संवर्धन के समय कोशिकाओं के विभेदन पर अनुकूल प्रभाव पड़ा है । एक प्रयोग में जिसमें मीसोडर्मल कोशिकाओं को संवर्धन माध्यम में रखा जाता है तो प्रोटियोग्लाइकेन अणु संवर्धन माध्यम में होते हैं तो ये कोशिकाएँ उपास्थि कोशिकाओं में विभेदित हो जाती है परन्तु इस प्रयोग में रेटिनोइड अणु संवर्धन माध्यम में डाल दिए जाते हैं तो विभेदन की क्रियाओं में प्रतिकूल प्रभाव पड़ता है ।

5.9. विभेदन के मार्कर

विभेदन क्रिया के समय बनने वाले विभिन्न संदेशवाहक आर.एन.ए, नवीनतम प्रोटीन तथा उनसे बनने वाले विभिन्न कारकों को विभेदन की विभिन्न अवस्थाओं में साइटोलोजिकल हिस्टोलोजिकल व बायोकेमिकल तकनीकों के द्वारा चिन्हित किया जा सकता है। वे पदार्थ जो कि विभेदन की विभिन्न प्रावस्थाओं को पहचानने में मदद करते हैं उन्हें मार्कर कहते है।

केन्द्रक में डी.एन.ए के मिथाइलेशन व डी मिथाइलेशन को चिन्हित करने वाले कारक कोशिका विभेदन की अत्यन्त पूर्ववर्ती अवस्थाओं को पहचानने में मदद करते हैं । सामान्य साइटो व हिस्टो तकनीक के द्वारा हिट्रोक्रोमेटिन व यूक्रोमेटिन को चिन्हित किया जा सकता है कुछ मोनो क्लोनल एण्टीबॉडी जैसे दी आर डी व यू आर डी इम्यूनो साइटो केमिकल तकनीक द्वारा चिन्हित करने से यह पता चल सकता है कि कोशिका गुणन अवस्था में है अथवा नहीं । इसी प्रकार रासायनिक विभेदन की अवस्था में उन विशिष्ट रसायनों को जो कि कोशिका द्रव्य में विभेदन क्रिया के पश्चात् बनने लगते है को चिन्हित किया जा सकता है । कोन्ड्रिन अणु के लिए बने अभिरंजक मीसोडर्म को उपास्थि में विभेदन के समय चिन्हित करने के काम में आते है । कोशिका विभेदन में जब अपने अंतिम चरण पर होता है तो उसमें होने वाले विशिष्ट आकारकीय परिवर्तनों जैसे विशिष्ट अंतरकोशिकीय आधात्री आदि को इलेक्ट्रोन सूक्ष्मदर्शी द्वारा चिन्हित किया जा सकता है । उपास्थि कोशिका विभेदन के समय अन्तर कोशिकीय आधात्री में उपस्थित विशिष्ट विन्यास वाले कोलेजन तन्तुओं की उपस्थित विभेदन की पृष्टि करती है ।

5.10 वृद्धि गीतकी:

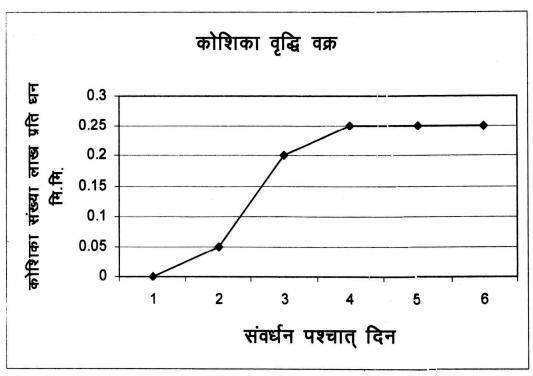
सभी जीवित कोशिकाओं को वृद्धि, प्रजनन एवं विभिन्न कोशिका घटकों के संश्लेषण के लिये कच्चे पदार्थ एवं ऊर्जा के स्त्रोत की आवश्यकता होती है। इसके लिए ये कोशिकाएं संवर्धन माध्यम से कार्बन हाइड्रोजन, ऑक्सीजन, नाइट्रोजन, फास्फोरस, सल्फर तथा विभिन्न वृद्धि कारकों को ग्रहण करती है और ये सभी नये प्रोटोप्लाज्म का संश्लेषण करते है जो कि वृद्धि कहलाती है अर्थात कोशिकीय घटकों की मात्रा में वृद्धि कोशिका वृद्धि कहलाती है। इसे प्रोटोप्लाज्मीय या जीवद्रव्यी वृद्धि भी कहते है। किसी भी कोशिका में होने वाली वृद्धि का वृद्धि वक्र द्वारा प्रदर्शित किया जाता है। जिसमें प्रमुखतया चार प्रावस्थायें होती है।

5.11 वृद्धि व्रक:

वृद्धि का अध्ययन कोशिकाओं के संवर्धन के वृद्धि वक्र के विश्लेषण पर किया जाता है जब कोशिकाओं की वृद्धि किसी तरल संवर्धन माध्यम में कराई जाती है तो कोशिकाओं में निरन्तर वृद्धि होती है जिससे धीरे- धीरे उस तरल संवर्धन माध्यम में पोषक तत्वों की कमी होती जाती है तथा विषाक्त पदार्थों की मात्रा में वृद्धि होती जाती है । धीरे-धीरे पात्र का आयतन कम होता जाता है जिससे उसमें उपस्थित कोशिकाओं की वृद्धि रूक जाती है ।

यदि कोशिकाओं की संख्या की लोग संख्या तथा समय अंतराल के मध्य ग्राफ बनाया जाये तो वृद्धि वक्र प्राप्त होता है जिसमें मुख्यतयाः चार प्रावस्थायें होती है:-

- (i) लेग प्रावस्था
- (ii) लोग प्रावस्था
- (iii) स्थिर प्रावस्था
- (iv) मृत्यु प्रावस्था
- (i) लेग प्रावस्था- इसे प्रारम्भिक प्रावस्था भी कहते है । इसमें जब कोशिकाओं को किसी संवर्धन माध्यम में प्रविष्ट कराया जाता है तो उस समय उन कोशिकाओं की संख्या तथा भार में तात्कालिक वृद्धि नहीं होती है क्योंकि इस प्रावस्था में कोशिकाओं में किसी प्रकार का कोशिका विभाजन नहीं होता है लेकिन क्रियात्मक दृष्टि से ये कोशिकायें अत्यधिक सिक्रय होती है तथा जीवद्रव्य का संश्लेषण करती है । इस प्रावस्था में डी एन ए, आर एन ए, प्रोटीन, एन्जाइम, कोएन्जाइम तथा उपापचयी पदार्थों का संश्लेषण होता है । इस प्रावस्था में 'कोशिकाएँ परिवर्तित वातावरण के अनुरूप स्वयं को परिवर्तित कर लेती है । लेग प्रावस्था का समय अलग-अलग कोशिकाओं के लिए अलग अलग होता है जो कि कोशिकाओं की स्थिति एवं माध्यम पर निर्भर करता है । संवर्धन माध्यम में परिवर्तन से लेग प्रावस्था का समय लम्बा हो जाता है । यदि कोशिका संवर्धन पुराना हो या कम तापमान पर जैसे फ्रिज में रखा हुआ हो तो लेग प्रावस्था का समय काल अपेक्षाकृत लम्बा हो जाता है । लेकिन यदि लेग प्रावस्था की अविध छोटी हो जाती हैं ।
- (ii) लोग प्रावस्था इस प्रावस्था में कोशिकाओं में वृद्धि प्रारम्भ हो जाती है तथा इस प्रावस्था में कोशिकीय प्रजनन अत्यधिक सिक्रय होता है तथा द्विगुणन की दर अत्यधिक तीव्र हो जाती है । हरस प्रावस्था का वक्र एक सीधी रेखा के रूप में प्राप्त होता है (चित्र 52) क्योंकि इस प्रावस्था में वृद्धि की दर निश्चित होती है । इस प्रावस्था में अधिकांशतः कोशिकाओं का जैव रासायनिक अध्ययन किया जाता है । इस प्रावस्था में प्रतिकूल परिस्थितियों का इनकी वृद्धि पर अत्यधिक प्रभाव होता है । जैसे विकिरणों एवं अनुलेखन व अनुवादन के कारण वृद्धि की कुछ प्रक्रिया अवरूद्ध हो जाती है ।



चित्र 5.2 कोशिका वृद्वि वक्र

- (iii) स्थिर प्रावस्था इस प्रावस्था में कोशिकाओं की जन्म 'दर तथा मृत्यु दर एक समान होती है । जिससे इनकी समिष्टि नियत बनी रहती है । लोग प्रावस्था में सूक्ष्मजीवों कोशिकाओं में अप्रत्याशित रूप से संख्या में वृद्धि होती है लेकिन पोषक पदार्थों की कमी, स्थानाभाव एवं विषाक्त पदार्थों के निर्माण के कारण कोशिकाओं की मृत्यु प्रारम्भ हो जाती है । जिससे जन्म दर तथा मृत्यु दर लगभग स्थिर बनी रहती है । स्थिर प्रावस्था के लिए निम्न कारक उत्तरदायी होते है:
- (1) पोषक पदार्थों की मात्रा में धीरे-धीरे कमी होती जाती है।
- (2) o_2 की उपलब्धता कम हो जाती है जिससे कोशिकाओं की वृद्धि रूक जाती है ।
- (3) माध्यम की पी. एच. परिवर्तित हो जाती है।
- (4) माध्यम का तापमान बढ़- जाता है ।
- (5) माध्यम में विभिन्न विषाक्त पदार्थ का एकत्रीकरण हो जाता है ।
- (iv) मृत्यु प्रावस्था, संवर्धन माध्यम में हुई पोषक पदार्थी की कमी, विषाक्त पदार्थी के निर्माण में वृद्धि, पी एच परिवर्तन आदी कारकों- के कारण कोशिकाओं की मृत्यु होना प्रारम्भ हो जाती है यद्यपि इस प्रावस्था में कोशिकाओं की संख्या प्रति इकाई आयतन में निश्चित होती है क्योंकि ये मृत कोशिका लियत (Lysis) नहीं होती है । अतः इन मृत कोशिकाओं का पता इनको शुद्ध संवर्धन माध्यम में वृद्धि कराने पर लगता है । इसमें मृत्यु दर धीरे-धीरे कम हो जाती है तथा उत्तरजीवी कोशिकाओं के रहने की संभावना बहुत कम होती है ।

5.12 सारांश:

इस अध्याय के अन्तर्गत हमने अध्ययन किया है कि किस प्रकार शरीर में विभिन्न कोशिकाओं में विभेदन प्रक्रिया पाई जाती है । विभेदन से अभिप्राय है कोशिकाओं का कोशिका चक्र से बाहर आकर कुछ विशिष्टता अर्जित करना जिससे कि वे अपनी पूर्ववर्ती अवस्था से भिन्न दिखाई दें । जब विभेदित कोशिकाओं को किसी पात्र में (इन-विट्रो) संवर्धित किया जाता है तो इनके लक्षण-गुण आदि परिवर्तित हो जाते है तथा इन कोशिकाओं के लक्षण इनके उत्पत्ति स्त्रोत की कोशिकाओं से पूर्णतया अलग हो जाते हैं । विभेदन की अवस्थाएँ दो प्रकार की होती हैं ।अर्धशक्त कोशिकीय विभेदन ताया जीर्णाद्वार कोशिकीय विभेदन । विभेदन प्रक्रिया आकारिकी, कार्यिकी, रासायनिक आदि कई प्रकार की होती हैं । विभेदन क्रिया का नियंत्रण जीनोम स्तर पर किया जाता है । किसी भी कोशिका को विभेदित होने से पहले कई प्रावस्थाओं से गुजरना पडता है । सर्वप्रथम कोशिकाएँ पूर्वनियोजित कार्यक्रम के अनुसार निश्चित संख्या के कोशिका चक्र संपन्न करती हैं । विभेदन से पहले इसके सामर्थ्य का जात होना आवश्यक है ताकि प्रेरण के प्रति अनुक्रिया दिखा सके । इसके पश्चात् इसमें निर्धारण की क्रिया होती है व अंत में एक विशिष्ट पथ में विभेदित हो जाती है । कोशिकाओं में वृद्धि गतिकी तथा वृद्धि वक्र की सहायता से उनकी विभिन्न अवस्थाओं का अध्ययन कर सकते है ।

5.13 शब्दावली

इन विट्रो - किसी कृत्रिम माध्यम में संवर्धन ।

अर्धशक्त कोशिका - ऐसी कोशिका जिससे विभिन्न प्रकार की कोशिकाओं का निर्माण हो सके जो सम्पूर्ण जीव शरीर का निर्माण कर सकें ।

संवर्धन माध्यम - ऐसा माध्यम जिसमें सभी आवश्यक तथा पर्याप्त मात्रा में, पोषक तत्व घुले रहते है जो कोशिका की वृद्धि में सहायक होते है ।

विभेदन - विभेदन से अभिप्राय है कोशिकाओं का कोशिका चक्र से बाहर आकर कुछ विशिष्टता अर्जित करना जिससे कि वे अपनी पूर्ववर्ती अवस्था से भिन्न दिखाई दें।

5.14 संदर्भ ग्रंथ:

डि रोबरटिस, अलबर्ट, कूपर

5.15 बोध प्रश्न:

- 1. ऐसा माध्यम जिसमें सभी प्रकार के आवश्यक पोषक तत्व पाए जाते हो तथा कोशिका की वृद्धि में सहायक हो...... कहलाते है ।
- 2. कोशिका वृद्धि का अध्ययनवक्र द्वारा किया जाता है ।

5.16 अभ्यासार्थ प्रश्नः

- (i) विभेदन प्रक्रिया क्या है? इसकी विभिन्न विशेषताओं के बारे में लिखो ।
- (ii) विभेदन कितने प्रकार का होता है? समझाइए ।

- (iii) विभेदन की क्रियाविधि को समझाइए? इस प्रक्रिया को नियंत्रित करने वाले कारकों पर प्रकाश डालिए ।
- (iv) वृद्धि गतिकी क्या है? लिखिये ।
- (v) वृद्धि वक्र की विभिन्न अवस्थाओं को समझाइए ।

कोशिका संवर्धन का रखरखाव । कोशिका जीवत्ता एवं विषालुता का मापन । उप संवर्धन। प्राणी कोशिका रेखा, उत्पति एवं विशिष्टीकरण ।

MAINTENANCE OF CELL CULTURE.

MEASUREMENT OF VIABILITY AND

CYTOTOXICITY. SUB-CULTURES. ANIMAL CELL LINE. THEIR ORIGIN AND CHARACTERIZATION.

इकाई की रूपरेखा

- 6.0 उद्देश्य
- 6.1 प्रस्तावना
- 6.2 कोशिका संवर्धन का रखरखाव
- 6.3 कोशिका जीवत्ता एवं विषाल्ता का मापन
- 6.4 उपसंवर्धन
- 6.5 प्राणी कोशिका रेखा, उत्पत्ति एवं विशिष्टिकरण
 - (i) एकल स्तर कोशिकाएं
 - (ii) निलम्बन कोशिकाएं
- 6.6 सारांश
- 6.7 शब्दावली
- 6.8 संदर्भ गन्ध
- 6.9 बोध प्रश्न
- 6.10 अभ्यासार्थ प्रश्न

6.0 उद्देश्य :

कोशिकाओं के संवर्धन से उत्पत्र कोशिका श्रृंखलाओं या समूहों से अनेक लाभदायक जैव रासायनिक तत्व जैसे इन्टरफेरोन, इन्टरल्युकिन पदार्थ, विभिन्न हार्मोन्स, किण्वक एवं प्रतिरक्षी प्राप्त किए जाते हैं । इसके अतिरिक्त विषाणु जनित रोग जैसे पोलियो, खसरा, हाइड्रोफोबिया तथा मवेशियों के लिये घातक मुख एवं पांव रोग एवं रिण्डरपेस्ट से बचाव हेतु टीके भी प्राप्त किये जाते हैं इन सभी के लिये बड़े पैमाने पर कोशिका संवर्धन हेतु विशेष फरमेन्टर तंत्र प्रयुक्त किये गये हैं ।

6.1 प्रस्तावना :

कोशिकाओं को परिभाषित रासायनिक माध्यम में रखकर संवर्धित किया जाता है तथा संवर्धन के पश्चात कोशिकाएँ संवर्धन पात्र के तल पर एकल स्थल का निर्माण करती है । इन कोशिकाओं को तल से यांत्रिक या एन्जाइम विधि द्वारा अलग कर इन पर विभिन्न प्रकार के परिक्षण किए जा सकते है जैसे कि कोशिकाओं विभेदन स्थिति, जीवत्ता तथा यदि संवर्धन माध्यम में किसी प्रकार की विपरित परिस्थितियाँ पैदा हो गई हों तो विषालुता का मापन । जीवत्ता व विषालुता मापन के अनेक विधियाँ होती है जो कि कोशिका संवर्धन की ग्णवता को इंगित करती है । कई बार संवर्धन माध्यम में उपस्थित फीनोल रेड इंडिकेटर जिसका सामान्य रंग गुलाबी होता है, के रंग परिवर्तन से भी प्रथम दृष्टया अनुमान लगाया जा सकता है कि कोशिकाएँ ठीक प्रकार से संवर्धित हो रही है अथवा नहीं । यदि संवर्धन माध्यम में किसी प्रकार का संदूषण हो जाता है तो फीनोल रेड इंडिकेटर माध्यम का रंग पीला दर्शाता है । यह पूर्व के अध्यायों में भी बताया जा चुका है कि निश्चित समय अंतराल के पश्चात् कोशिकाओं को स्वच्छ ताजा माध्यम से फीडिंग करवाई जानी चाहिए अन्यथा संवर्धन के संदूषण की संभावनाएँ बनी रहती है । कोशिकाएँ जब मूल संवर्धन से अनेकों बार संवर्धित की जाती है तो इसे उपसंवर्धन कहते है । उपसंवर्धन के पश्चात् यदि कोशिकाएँ अपनी विशिष्टताएँ संजोये रहती है तथा शीतलीकरण के पश्चात भी निरंतर उपसंवर्धित की जा सके तो वे एक कोशिका रेखा (Cell Line) का रुप ले लेती है आज अनेकों कोशिका रेखाएँ व्यवसायिक रुप से उपलब्ध हैं जिन पर विभिन्न प्रयोग किए जा रहे हैं ।

6.2 कोशिका संवर्धन का रख रखाव:

जब किसी प्राथमिक कोशिका संवर्धन को उचित माध्यम से संवर्धित कराया जाता है तो कोशिकाओं की संख्या में वृद्धि होती है तथा संवर्धन माध्यम की पोषण क्षमता भी घटती जाती है । इस कारण उस प्राथमिक कल्चर से उपकल्चर प्राप्त करना आवश्यक होता है । उपकल्चर के दौरान एक समयुग्मजी कोशिका लाईन की उत्पत्ति होती है । अब इस संवर्धन को कोशिका शृंखला कहा जाता है जिसमें आवश्यकता के अनुसार संवर्धित किया जा सकता है एवं भंडारित भी किया जाता है ।

कोशिका श्रृंखला से तात्पर्य यह है कि किसी एक कल्चर में समान या असमान अनेक कोशिका लाईन पाई जाती है । कोशिका लाईन की आयु परिमित या फिर सतत् होती है ।

अधिकाशंतः प्राथमिक संवर्धन या सतत् संवर्धन शृंखला एकल स्तर के रूप में वृद्धि करती है । इसलिए इन कोशिका लाइनों के माध्यम को रह-रहकर एक निश्चित समय अन्तराल पर बदलना चाहिए । प्रचुरित कोशिकाओं से युक्त कल्चर में आसंजित कोशिकाओं के सब लल्चर के दौरान संवर्धन माध्यम को बदलना चाहिए एवं ट्रिपिसन या किसी अन्य विघटनकारी किण्वक द्वारा कोशिकाओं को एक स्तर से दूसरे स्तर पर कुछ कोशिकाओं को पृथक किया जाता है । उपकल्चर तथा माध्यम को बदलने के मध्य समय अन्तराल कोशिका शृंखला की संरचनात्मक गुणों के अनुसार परिवर्तित हो सकती है । उदाहरणार्थ HeLa कोशिकायें तीव्र दर से संवर्धन करते है इसलिए इनका 7 दिन में एक बार अवश्य उपकल्चर किया जाता है । इसके साथ माध्यम को प्रत्येक 4 दिन में बदलाव किया जाता है ।

धीमी गति से संवर्धन करने वाले कोशिकाओं के कोशिका श्रृंखलाओं के माध्यम को 7 दिन में बदला जाता है जबिक इनका उपकल्चर प्रत्येक 2,3, एवं 4 सप्ताह में कम से कम एक बार अवश्य किया जाता है।

कोशिका संवर्धन के समय बैक्टीरिया, कवक यीस्ट एवं प्रोटोजोआ तथा माइकोप्लाज्मा के संक्रमण को रोका जाना अत्यावश्यक होता है । इसलिए संवर्धन माध्यम में जेन्टामाइसिन, पेनिसीलिन स्ट्रेप्टोमाईसिन,टाईलोसिन एवं नायस्टेटिन जैसे प्रतिजैविक पदार्थों को उचित मात्रा में मिलाया जाना चाहिए ।

"अर्ल का संतुलित लवण विलयन (EBSS)" हैन्क का संतुलित लवण विलयन (HBSS)" एवं "डल्बेको का फॉस्फेट बफर सेलाइन विलयन" (PBS-A) का रसायनिक संगठन -

घटक	अर्ल का विलयन	हैन्क विलयन	डल्बेको विलयन
			(PBSA,ca ²⁺ एवMg ²⁺ रहित)
CaCl₂एनहाइड्रस	20(0.18mM)	140 (1.26 mM)	
KCL	40(0.536 Mm)	400 (5.36 mM)	200(2.68 mM)
KH ₂ PO ₄		60 (0.44 mM)	200(1.47 mM)
MgCl ₂ .6H ₂ O		100(0.49 mM)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 (0.82 mM)	100(0.41 mM)	
NaCl	6680 (114.4	8000(137 mM)	8000(137 mM)
	mM)		
NaHCO₃	2220 (2.22 mM)	350(0.35 mM)	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O		90 (0.34 mM)	2160 (8.06 mM)
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	140 (0.53 mM)		
<u>अन्य</u>			
डी- ग्लुकोज			
1000(5.55mM)			
1000(5.55 mM)			
फिनॉल रेड	10	10	

EBSS तथा HBSS को उपयोग से पूर्व Ph6.5 से कम pH पर 15 पाउण्ड / इंच 2 दाब पर 20 मिनट तक ऑटोक्लेव किया जाता है । pH को 7.4 तक निर्जीवाणुक NaOH के साथ मिलाकर समंजित किया जा सकता है ।

- 1. सामान्य कार्यो (हैण्डलिंग, धोना एवं विच्छेदन हेतु विलयन के रूप में) में उपयोग के लिये EBSS एवं HBSS से ग्लुकोज एवं NaHCO $_3$ घटकों को हटा दिया जाता है । विच्छेदन संबंधी कार्यों के लिये संतुलित लवण विलयन में प्रतिजैविक पदार्थ जैसे पेनिसिलिन (250 μ / मिली), स्ट्रेप्टोमायसिन (25 μ / मिली), कानामायसिन (100 μ g / मिली) एवं फन्गीजोन (2.5g / 1) मिलाया जाता है ।
- 2. D-PBSA विलयन का उपयोग कोशिकाओं के पृथक्कीकरण के पूर्व धोने हेतु तथा ट्रिप्सिन को तनुष्कृत करने के लिये भी किया जा सकता है।
- 3. D-PBSA को EDRA विलयन (Na_2 EDTA. $2H_2$ O-372mg/1पर,1mM) को तैयार करने के लिये एक आधारी विलयन के रूप में उपयोग में लिया जाता है ।तत्पश्चात् उपयोग से पूर्व इस विलयन को ऑटोक्लेव किया जाना चाहिए ।

6.3 कोशिका जीवत्ता एवं विषालुता का मापन:

कोशिका की जीवत्ता (CELL Viability) - कोशिकाओं के विशेष वातावरण या संवर्धन माध्यम में पनपने तथा संवर्धन करने की क्षमता कोशिका की जीवन क्षमता कहा जाता है । यह जीवन क्षमता किसी भी चयनित कोशिकीय समृह में जीवित कोशिकाओं की संख्या को दर्शाता है ।

कोशिकीय जीवन क्षमता का आकलन संघातक कोशिकाओं के जीवन या मृत्यु एवं प्रत्यारोपित अंगों के ग्राही जन्तु की देह द्वारा अस्वीकार किये जाने से संबंधित प्रतिक्रियाओं के विश्लेषण में अत्यन्त महत्वपूर्ण सिद्ध होता है । अतः कोशिकाओं की जीवन क्षमता के आकलन के लिये अनेक प्रकार के रासायनिक परीक्षण तंत्र विकसित किये गये हैं । इन परीक्षणों के अन्तर्गत कोशिकाओं के कार्यिकी से संबंधित किसी रासायनिक उपापचयी उत्पाद की मात्रा का आकलन किया जाता है ।

कोशिका विषालुता (Cytotoxicity) - जब कोशिका को क्षिति या उसकी मृत्यु बाहय वातावरण से प्राप्त रासायनिक पदार्थों के द्वारा उत्पन्न हानिकारक प्रभावों के कारण होती है तो इसे कोशिका विषालुता कहा जाता है । इस प्रकार के हानिकारक पदार्थ देह के प्रतिरोधक तंत्र के द्वारा उत्पन्न घुलनशील रासायनिक यौगिक होते हैं अथवा बाहय वातावरण से कोशिका माध्यम में प्रवेश करते हैं । इन हानिकारक यौगिकों के कारण संवर्धन समूह की कोशिकाएं पहले संवर्धन करना बंद कर देती है एवं निष्क्रिय होकर अन्ततः मृत्यु को प्राप्त होती है । वास्तव में कार्यिकीय स्तर पर कोशिका की विषालुता एवं जीवन क्षमता एक दूसरे से संबंधित प्रावस्थाएं होती हैं । कोशिका संवर्धन की निरन्तर देख रेख बहुत आवश्यक होती है इसिकये सवर्धनकर्ता जटिल सूक्ष्मदर्शी द्वारा निरन्तर कोशिकाओं की जांच करते रहते हैं । वर्तमान समय में संवीप्तिमान सूचक अणुओं के माध्यम से कोशिकाओं के ऑक्सीकारी क्षमता, माइटोकोन्ड्रिया की कार्यिकी तथा सल्फाहाइड्रिल (-SH) इत्यादि क्रियाशील समूह की अन्तरा कोशिकीय सान्द्रता तथा कैल्सियम, पोटेशियम, सोडियम एवं हाइड्रोजन आयन्स की मात्रा का ज्ञान हो जाता है । वास्तव में कोशिकीय विषालुता का आकलन दो आधार पर किया जाता है:-

- 1. अल्प अन्तराल विषालुता
- 2. दीर्घ अन्तराल विषालुता

- 1. **अल्प अन्तराल विषालुता** अल्पकाल की विषालुता एवं अध्ययन कोशिकाओं में से असामान्य रूप से अन्तरा कोशिकीय माध्यम में महत्वपूर्ण पोषक पदार्थों का बहिसत्रावण (जिससे कोशिका क्षतिग्रस्त हो जाती है) एवं कोशिका अंगकों में हुए परिवर्तनों की व्यापकता के आधार पर किया जाता है।
- 2. दीर्घ अन्तराल विषालुता- दीर्घ अन्तराल विषालुता के अध्ययनों में कोशिकाओं का वृद्धि सामर्थ्य, कोशिका क्षय, निर्धारित कोशिका मृत्यु (Apoptosis), डी एन ए एवं आर एन ए जैसे महत्वपूर्ण रासायनिक अणुओं में रेडियोधर्मी यौगिकों का समायोजन इत्यादि प्रक्रियाओं का आकलन किया जाता है । कोशिकीय विषालुता के अध्ययन के लिये कोशिका शृंखलाओं का उपयोग किया जाता है । इनमें N1E-115 (चूहे का न्युरोब्लास्टोमा), PC-12 (चूहे की एड्रीनल ग्रन्थि में स्थित आबुर्द),SK-N-S11 (मानव न्युरोब्लास्टोमा),Hepa-1 (चूहे के यकृत में आबुर्द) इत्यादि प्रमुख हैं ।

कोशिका की जीवत्ता एवं विषालुता के मापन की विधियों-

इसके लिये कुछ विशेष परीक्षण व्यवस्थाएं विकसित की गयी हैं -

- (i) कोशिका के ATP उत्पादन क्षमता का आंकलन किसी भी जीवनक्षम कोशिका के लिये उर्जा की अति आवश्यकता होती है इसके लिये उसे एक निश्चित दर पर ATP अणुओं का संश्लेषण करना पड़ता है । यदि कोशिका की कार्यिकी में कोई परिवर्तन होता है तो उसके द्वारा उत्पन्न ATP की उत्पन्न मात्रा में भी अन्तर आता है । इसलिये वैज्ञानिकों ने कोशिका संख्या-संदीप्ति कोशिका जीवन क्षमता आकलन (Cell Titer Glow Luminiscent Cell Viability Assay) व्यवस्था का विकास किया है । इस परीक्षण के अन्तर्गत जन्तुओं में प्रकाश उत्पन्न करने के लिये ल्युसीफरेज किण्वक (Luciferase Enzyme) द्वारा प्रेरित अभिक्रिया की तीव्रता का आकलन किया जाता है जिससे तत्पश्चात् जीवनक्षम कोशिकाओं द्वारा उत्पन्न ए.टी.पी. की मात्रा को जात किया जाता है ।
- (ii) कोशिका संख्या नीली कोशिका जीवन क्षमता परीक्षण व्यवस्था (Cell Titer Glow Luminiscent Cell Viability Assay) इस परीक्षण व्यवस्था के अन्तर्गत रेसाज्युरीन (Resazurin) नामक यौगिक युक्त एक अनुकूलित अभिकर्मक पदार्थ को परीक्षण माध्यम में कोशिकाओं के साथ मिलाया जाता है जिसकी दर 20 μl अभिकर्मक 100μl कोशिका संवर्धन होती हैं । तत्पश्चात् कोशिकाओं की उपापचय की दर को आकलन किया जाता है । किसी भी कोशिका लल्चर में जीवनक्षम तथा जीवनअक्षम (Viable and Non-Viable cells) कोशिकाओं की संख्या संवर्धन की सफलता का निर्धारण करते हैं । इस कारण कुछ ऐसी परीक्षण व्यवस्थाएं भी विकसित की गयी हैं जो संवर्धन समूह में जीवित एवं मृत कोशिकाओं का आकलन करते हैं । इस प्रकार की कुछ परीक्षण व्यवस्थाएं निम्नलिखित हैं :-
- (iii) जीवित / मृत कोशिका जीवन क्षमता / कोशिका विषालुता परीक्षण (Live / Dead, Viability / Cytotoxicity Assay) :- इसके अन्तर्गत दो रंगों से युक्त संदीप्त कोशिका जीवन क्षमता की व्यवस्था होती है एवं इसमें मृत एवं जीवित कोशिकाओं की संख्या का आकलन एक ही

साथ किया जाता है। इस परीक्षण मकोशिकाओं के दो प्रमुख जीवन क्षम प्रक्रियाओं या घटकों का आकलन किया जाता है.

- (अ)- अन्तरा कोशिकीय एस्टरेज किण्वक की सक्रियता (Intracellular Esterase Enzymes Activity)
- (ब)- कोशिका झिल्ली के संरचनात्मक संगठन का विश्लेषण (Analysis of Integrity of plasma Membrane Structure) इसके लिये एक विशेष बहु ऋणात्मक आयनों से युक्त (Polyanionic) तथा संदीप्तिमान केल्सीन (Calcein) अभिरंजक डाई पदार्थ का उपयोग किया जाता है । यह परीक्षण अधिकांश यूकेरियोटिक कोशिकाओं एवं कुछ ऊतकों के लिये कारगर सिद्ध हु आ है । किन्तु जीवाण् एवं यीस्ट जैसे जीवों के लिये यह कारगर नहीं है । इस परीक्षण में यह माना जाता है कि जीवित कोशिकाओं में एक सर्वथा उपस्थित अन्तरा कोशिकीय किण्वक पाया जाता है । जब कोशिका कल्चर में निष्क्रिय एवं कोशिका झिल्ली के लिये पारगम्य अदीप्त केल्सीन का मिलाया जाता है तो कोशिकीय एस्टेरेज किण्वक केल्सीन को दीप्तिमान केल्सीन में रूपान्तरित कर देता है। केल्सीन जीवित कोशिकाओं में संदीप्तिमान हरे रंग को उत्पन्न करता है । केल्सीन के अतिरिक्त इस परीक्षण में इथाईडियम-होमो डाईमर-1 (Ethidium-homodimer-1) का भी उपयोग किया जाता है । इथाईडियम-1 क्षतिग्रस्त प्लाज्मा झिल्ली से युक्त कोशिकाओं में प्रवेश करता है एवं जीवद्रव्य में पहुंचने के बाद इथाईडियमव 40 ग्ना अधिक संदीप्तिमान हो जाता है एवं लाल रंग प्रदर्शित करता है । इथाईडियम सामान्य प्लाज्मा झिल्ली युक्त कोशिकाओं के द्वारा परित्याग कर दिया जाता है । इस विधि द्वारा आबुर्द क्षयकारी कारक (Tumor Necrosis Factor), β-एमाईलॉइड प्रोटीन (β-Amyloid Protein), एडीनोवायरस (Adenovirus)- E1A प्रोटीन इत्यादि का भी परीक्षण किया गया है।
- (iv) **एम.टी.टी. परीक्षण** (MTT Assay):- एम.टी.टी एक विशेष टेट्राजोलियम लवण यौगिक होता है जो अपचयन के पश्चात बैंगनी रंग के फॉर्माजान में परिवर्तित हो जाता है । परीक्षण के अन्तर्गत कोशिका लल्चर में एम.टी.टी. विलयन मिलाया जाता है जो तत्पश्चात कोशिकाओं में प्रवेश करता है और माइटोकोन्ड्रिया के किण्वक एम.टी.टी. को अपचयित कर फॉर्माजान में परिवर्तित कर देते हैं । अतः एम.टी.टी. परीक्षण के द्वारा उपापचयी रूप से सक्रिय कोशिकाओं का पता लग जाता है । कोशिका लल्चर द्वारा उत्पन्न फॉर्माजान की मात्रा के आकलन के द्वारा जीवित कोशिकाओं की संख्या को ज्ञात किया जाता है ।
- (v) **एक्स.टी.टी परीक्षण** (XTT-Assay)- एक्स.टी.टी भी एक टेट्राजोलियम लवण होता है जो जीवित लल्चर कोशिकाओं के माइटोकोन्ड्रिया के किण्वकों के द्वारा अपचयित होने पर नारंगी रंग का एवं जल में घुलनशील उत्पाद का निर्माण करता है। नारंगी उत्पाद की मात्रा के आकलन से जीवित कोशिकाओं की संख्या को जात किया जाता है।

उक्त सभी परीक्षणों में संदीप्तिमान पदार्थी का बोध करने के लिये विशेष उपकरण जैसे स्पेक्ट्रोफोटोमीटर का उपयोग किया जाता है।

6.4 उपसंवर्धनः

कोशिकाओं के जन्तु देह के बाहर कृत्रिम रूप से संवर्धन को कोशिका संवर्धन कहा जाता है । सामान्यतः कोशिका लल्चर परिक्षिप्त (पृथकृत) कोशिकाएं एक स्तर में (Monolayer) या फिर निलम्बनों (Suspensions) के रूप में संवर्धन किये जाते हैं ।

ऐसे कोशिका संवर्धन समूह जिनको मूल ऊतक से पृथक कर पहली बार संवर्धन किया जाता है प्राथमिक कोशिका संवर्धन (Primary Cell कल्चर) कहते हैं । इस प्रकार के प्राथमिक संवर्धन समूह के एक भाग या उप समूह को पुन: संवर्धन करने को उपसंवर्धन या सबकल्चर कहा जाता है ।

प्राथमिक कोशिका संवर्धन समूह में सामान्यतः अनेक विविध प्रकार की कोशिकायें होती है। जिनमें से अधिकांशतः धीमी गित से वृद्धि करने वाली कोशिकाएं होती है। इसके अतिरिक्त प्राथमिक कोशिकाएं अपने उत्पादक या जनक ऊतक (Parents tissue) के लक्षणों को प्रदर्शित करते है। प्राथमिक संवर्धन के उपभाग के उपसंवर्धन से कोशिका श्रृंखला या श्रृंखला प्राप्त होती है। यदि उपसंवर्धन की कोशिकायें केवल कई उपसंवर्धन तक ही जीवित रहती है, उन्हें सीमित या परिमित कोशिका लाईन या श्रृंखला कहा जाता है किन्तु जब उपसंवर्धन की कोशिकायें अनेक बार संवर्धन करने के पश्चात् भी जीवित रहते है अर्थात ये अनन्त काल संवर्धन करने की क्षमता रखते है तो इन कोशिका लाइनों या श्रृंखला को सतत् कोशिका श्रृंखला (Continuous Cell Lines) कहा जाता है।

सामान्यतः ऊतक परिमित कोशिका शृंखला को ही जन्म देती है, किन्तु आबुर्द्ध (Tumor) की कोशिकाओं से सतत् कोशिका प्राप्त होती है । कुछ विशेष सतत् शृंखलाएँ ऐसी भी होती है जो सामान्य ऊतक से ही प्राप्त किये जाते है तथा स्वयं आबुर्द्ध कोशिका लक्षणों को प्रदर्शित नहीं करती (जैसे 3T3 fibroblasts) । वैज्ञानिकों के अनुसार प्राथमिक संवर्धन की कोशिकाओं में किसी उत्परिवर्तन के कारण ही सतत् संवर्धन शृंखलाएँ उत्पन्न होती है । सामान्यतया यह देखा गया है कि ऊत्तक या कोशिकाओं का संवर्धन तथा उनका उपसंवर्धन एक सीमित अन्तराल तक ही किया जा सकता है एवं उसके बाद संवर्धन कोशिकाओं की मृत्यु हो जाती है । हेपिलक (Hayflick) एवं म्र्रहेड (Moorehead) नामक वैज्ञानिकों ने यह पाया कि प्रत्येक प्रकार की कोशिका अपनी जैविक विशेषता के कारण एक निश्चित संख्या में ही समस्त्री विभाजन करने की क्षमता रखती है एवं तत्पश्चात् ये निष्क्रिय हो जाती है अर्थात् कोशिकाओं की विभाजन क्षमता पर इस प्रकार से लगे प्राकृतिक प्रतिबन्ध को हेपिलक प्रतिबन्ध कहा जाता है । इस प्रतिबन्ध के कारण कोशिकाओं का अन्त काल तक संवर्धन नहीं किया जा सकता है । मानव की कोशिकाओं में यह संख्या लगभग 50 होती है । हेपिलक प्रतिबन्ध प्रत्येक प्रजाति के लिये विशिष्ट होता है । यह प्रतिबन्ध पादप कोशिकाओं में सामान्यतः नहीं पाया जाता है ।

सामान्य परिस्थितियों में मानव की कोशिकाओं से उत्पन्न प्राथमिक संवर्धन में कोशिकाएं लगभग 23 से 24 बार ही विभाजन करती हैं एवं उसके बाद निष्क्रिय हो जाती हैं । किन्तु कुछ विशेष कोशिकाओं में विभाजन संबंधी नियमनकारी तंत्र किसी उत्परिवर्तन या किसी अन्य कारक दवारा लाये गये परिवर्तन के कारण अप्रभावी हो जाता है जिसके कारण कोशिकाएं इस प्रतिबंध से

मुक्त हो जाती हैं और हेपिलक प्रतिबन्ध का पालन नहीं करती । इसके कारण इनका अनन्त काल तक संवर्धन किया जा सकता है ।

प्राथमिक कोशिका संवर्धन की कोशिकायें स्पर्श संदमन (Contact inhibition) प्रक्रिया को दर्शाती है । इस प्रक्रिया के फलस्वरूप कोशिकायें अभिविन्यासित समानान्तर पट्टिकाओं के रूप में व्यवस्थित हो जाती है ।

प्राथमिक कोशिका संवर्धन की कोशिकायें स्वयं में द्विगुणित गुणसूत्र संख्या (Diploid Karyotype) को बनाये रखते है ।प्राथमिक संवर्धन के लिए वृक्क, फुक्फुस, यकृत, थाईराइड एवं वृषण जैसे अंगों से कोशिका प्राप्त की जाती है । प्राथमिक संवर्धन की कोशिकायें प्राकृतिक परिस्थितियों में दर्शाये गये लक्षणों को प्रतिबिम्बित करती है ।

6.5 प्राणी कोशिका, रेखा उत्पत्ति एवं विशिष्टीकरण:

कोशिका शृंखलाएं (CELL LINES)- कोशिका लाइन मुख्यतया दो प्रकार की होती हैं ।

- 1. एकल स्तर कोशिकायें (Monolayer Cells)
- 2. निलम्बन कोशिकायें (Suspension Cells)
- 1. एकल स्तर कोशिकायें ये कोशिकायें किसी फ्लास्क के प्लास्टिक सतह के साथ संलग्न हो जाती है । इनका लल्चर हेतु उपयोग करने से पूर्व आसंजक सतह से पृथक्करण आवश्यक होता है ।
- 2. निलम्बन कोशिकायें ये कोशिकायें सामान्यतः लल्चर माध्यम में उपस्थित किसी प्लेट या फ्लास्क के सतह पर चिपकते नहीं है ।

कोशिका लाईनों का एक बडा लाभ होता है कि इनका उपयोग करना प्राथमिक संवर्धन कोशिकाओं के तुलना में अधिक सरल होता है । इसके अलावा ये कोशिका लाईन निरन्तर संवर्धन करने की क्षमता रखती है जिससे बहुत अधिक संख्या में इन्हें प्राप्त किया जा सकता है ।

किसी कोशिका लाईन में मुख्यतः तीन प्रकार की कोशिकायें पायी जाती है ।

- 1. पूर्ववर्ती या स्टेम कोशिकायें (Precursor or Stem Cells)- ये संवर्धन करने में सक्षम होती है किन्तु अविभेदित रूप से ही रहती है । उपयुक्त उत्तेजक कारकों के प्रभाव में ये अविभेदित से विभेदित रूप में परिवर्तित हो जाती है ।
- 2. अविभेदित कोशिकार्ये (Undifferentiated Cells) -अविभेदित कोशिकार्ये वास्तव में निर्धारी, पूर्ववर्ती या आदि कोशिकार्ये हैं । इनमें विभेदन सुनिश्चित हो चुका होता है ।
- 3. **परिपक्व विभेदित कोशिकायें (Mature Differentiated Cells)** ये पूर्ववर्ती कोशिकाओं से प्राप्त होती है एवं विभाजन नहीं करती हैं ।

भ्रूण से प्राप्त कोशिका श्रृंखला में स्तंभ कोशिकायें (आदि पूर्ववर्ती कोशिकायें) अधिक होती है तथा वयस्कों से प्राप्त कोशिकाओं की तुलना में अधिक मात्रा में स्वः नवीनीकरण पाई जाती है ।अधिचर्म, आंत्रीय एपिथीलियल कोशिकायें तथा हीमोपोयिटक (मज्जा) कोशिकायें प्राकृतिक पिरिस्थितियों में निरन्तर स्वः नवीनीकरण करती रहती है अतः ऐसे ऊतकों से प्राप्त संवर्धन में स्तम्भ कोशिकायें पाई जाती है जो अनिश्चित काल के लिये जीवित रहती है । दूसरी ओर कुछ ऐसे दैहिक ऊतक भी है जो केवल असामान्य पिरिस्थितियों में ही विभाजित होकर स्वःनवीनीकरण

करती है। इनमें मासपेशियाँ कोशिकायें, ग्लीया कोशिकायें एवं फाइब्रोब्लास्ट कोशिकायें प्रमुख है। इनमें से प्राप्त संवर्धन में केवल निर्धारित पूर्ववर्ती कोशिकायें ही पायी जाती है जिनकी आयु सीमित होती है। प्राथमिक संवर्धन के इन तीनों प्रकार के कोशिकाओं से कोशिका श्रृंखला विकसित की जा सकती है। प्रथम उपसंवर्धन के पश्चात् प्राथमिक संवर्धन स्वयं कोशिका श्रृंखला बन जाती है तथा इससे अनेक उपसंवर्धन प्राप्त किए जा सकते हैं। प्रत्येक अनुक्रमित उपसंवर्धन के बाद सबसे तीव्र दर से प्रचुरित होने वाली कोशिकाओं का वर्चस्व स्थापित हो जायेगा किन्तु धीमी गित से प्रचुरित होने वाली कोशिकाओं एवं प्रचुरित न होने वाली कोशिकाओं की संख्या कम होती जाती है।

स्थापित कोशिका श्रृंखला के सदस्यों में गुणसूत्र की संख्या में परिवर्तन आता है तथा किन्हीं दो विभाजनों के बीच विश्रामावस्था भी सामान्य से काफी कम होती है । इसके अतिरिक्त स्थापित कोशिका श्रृंखला के सदस्य स्पर्श-निरोध की प्रक्रिया को नहीं दर्शाते है ।

उल्लेखनीय है कि अपने अपरिवर्तित रूप या मूल स्वरूप में कोशिका शृंखला का संवर्धन सीमित समय के लिए ही होता है जिसके पश्चात् इनकी या तो मृत्यु हो जाती है या फिर सतत् कोशिका शृंखला में परिवर्तित हो जाते है ।सतत् कोशिका शृंखला के सदस्यों गुणसूत्रों की संख्या में बड़े परिवर्तन होते है । ये कोशिकायें अक्सर भिन्न एकसूत्री प्रकार की होती हैं । कोशिका संवर्धन इस प्रकार सीमित शृंखलाओं से परिवर्तित होकर सतत् कोशिका शृंखला को उत्पन्न करने की प्रवृति को इन-विट्रो रूपान्तरण कहा जाता है ।

निरन्तर उपयोग में लाई जाने वाली कोशिका लाइन्स

नाम	प्रकार	आकारिकी	उद्भव
MCR 5	सीमित	फाइब्रोब्लास्ट	मानव भ्रूण फुफ्फुस
W-138	सीमित	फाइब्रोब्लास <u>्</u> ट	मानव भ्रूण फुफ्फुस
IMR 90	सीमित	फाइब्रोब्लास <u>्</u> ट	मानव भ्रूण फुफ्फुस
BHK 21	सीमित	फाइब्रोब्लास <u>्</u> ट	नवजात सिरियन चूहा (हैमस्टर) के वृक्क
CHOK 1	सीमित	फाइब्रोब्लास <u>्</u> ट	व्यस्क चीनी हैमस्टर अण्डाशय
HeLa	सीमित	फाइब्रोब्लास्ट	ट्यस्क मानव
Vero	सीमित	फाइब्रोब्लास्ट	व्यस्क मानव

6.6 सारांश:

कोशिकाओं को कृत्रिम अनुकूल परिवर्धन माध्यम उपलब्ध करवाकर उन्हें संवर्धन हेतु प्रेरित कर संख्या में वृद्धि कराये जाने को कोशिका संवर्धन कहते हैं ।

सामान्यतः पादप कोशिकाओं का संवर्धन जन्तु कोशिकाओं की तुलना में सरल होता है। क्योंकि पादप कोशिकाओं को सरल पोषक पदार्थों की आवश्यकता होती है। जबिक जन्तु कोशिकाओं को संवर्धन के लिये जटिल पोषक यौगिकों की आवश्यकता होती है। सामान्यतः कोशिकाओं में विभाजन करने की क्षमता कार्यिकी के आधार पर निर्धारित होती है। कुछ कोशिकाएं लगातार विभाजन करने की क्षमता रखती है। जबिक कुछ कोशिकाएं सीमित संख्या में

ही विभाजन कर जन्तु में किसी विशेष कार्य को करने के लिये संरचनात्मक तथा कार्यिकीय स्तर पर विशिष्टीकृत हो जाती हैं। तत्पश्चात् वे विभाजन नहीं करती हैं। इनमें तिन्त्रका कोशिकाएँ, ग्रंथिल कोशिकाएं एवं आन्त्रीय रसांकुर की कोशिकाएं प्रमुख है जबिक आबुर्द जैसी संरचनाओं की कोशिकाएं लगातार विभाजन करती रहती हैं। प्रत्येक कोशिका विभाजन द्वारा स्वयं की तरह संतित कोशिकाओं को उत्पन्न करती है। जब संवर्धन हेतु प्रथम बार कोशिकाओं के द्वारा संवर्धन किया जाता है तो इसे प्राथमिक संवर्धन कहा जाता है तथा इसी मूल संवर्धन के किसी एक भाग को पृथक कर पुन: संवर्धन के लिये रखा जाता है तो उसे उप संवर्धन (Sub Heading) कहा जाता है। एक ही जनक कोशिकाओं की विभाजन क्षमता सीमित हो जाने के कारण उनके द्वारा उत्पन्न कोशिका शृंखला की आयु भी सीमित होती है। इन्हें सीमित कोशिका शृंखला कहा जाता है। किन्तु आबुर्द की कोशिकाओं या फिर इन्हों की भांति जन्तु में पायी जाने वाली कुछ आदि जनक कोशिकाएं निरन्तर विभाजन करती रहती हैं। इसिलये इनके द्वारा संतितयों की उत्पति निरन्तर होती रहती है। अतः इस प्रकार से प्राप्त कोशिका शृंखला को सतत् कोशिका शृंखला कहा जाता है।

कोशिका संवर्धन हेतु विभिन्न प्रकार के प्राकृतिक माध्यम (स्कंदित प्लाज्मा, सीरम एवं अन्य जैविक द्रव तथा ऊतक निष्कर्ष) तथा कृत्रिम माध्यम (अर्ल का विलयन, हैन्क विलयन एवं ईगल का माध्यम, RPMI 1640 F12, CMRL 1066 इत्यादि) का उपयोग किया जाता है जो संवर्धन हेतु कोशिकाओं का आवश्यक पोषक पदार्थ प्रदान करते हैं।

एक कोशिका संवर्धन द्वारा उत्पन्न कोशिका श्रृंखला में स्टेम कोशिकाएं, अविभेदित कोशिकाएं एवं परिपक्व विभेदित कोशिकाएं पायी जाती हैं। प्रत्येक प्रकार की मात्रा प्राथमिक संवर्धन को उत्पन्न करने वाले मूल जनक कोशिका की कार्यिकी पर निर्भर करता है। वर्तमान समय में कुछ प्रचलित मानक सीमित कोशिका श्रृंखला MRC 5, W 138 एवं IMR 90 है। जबिक BHK 21, CHOK 1, HeLa एवं Vero प्रमुख सतत कोशिका श्रृंखला है। निरन्तर कोशिका संवर्धन के कारण संवर्धन माध्यम में आवश्यक पोशक तत्वों की कमी हो जाती है। इसके अतिरिक्त संवर्धन माध्यम में लगातार कोशिका संख्या में वृद्धि के कारण अव्यवस्था उत्पन्न हो जाती है इसलिये कोशिकाओं का संवर्धन स्पर्श संदमन प्रक्रिया के कारण संदमित होने लगती है। इससे बचने के लिये मूल या प्राथमिक कोशिका संवर्धन समूह से कुछ भागों को हटाकर एक नये माध्यम में संवर्धन के लिये रखा जाता है जिसे उपसंवर्धन (Sub Culture) कहते हैं। कोशिकाओं की कार्यिकी के आधार पर संवर्धन की दर एवं क्षमता निर्धारित होती है। कोशिका संवर्धन के समय संक्रमण उत्पन्न हो सकता है जिसे रोकने के लिये जेन्टामायसिन पेनिसिलिन, स्ट्रेप्टोमायसिन इत्यादि प्रतिजैविक पदार्थी को मिलाया जाना चाहिये

6.7 शब्दावली:

1. **कोशिका संवर्धन** - कोशिकाओं के जन्तु देह के बाहर कृत्रिम रूप से उपलब्ध कराये गये रासायनिक पोषक वातावरण (माध्यम) में विभाजन कर स्वयं की भांति संतित कोशिकाओं को उत्पन्न करने की व्यवस्था को कोशिका संवर्धन कहा जाता है ।

- 2. **प्राथमिक कोशिका संवर्धन-** जब जनक ऊतक से पृथक करने के बाद किसी कोशिका का प्रथम बार संवर्धन किया जाता है तो उससे प्राप्त संतित कोशिकाओं के समूह को प्राथमिक कोशिका संवर्धन कहा जाता है ।
- 3. **उपसंवर्धन-** जब प्राथमिक संवर्धन समूह से प्राप्त किसी कोशिका समूह का पुनः संवर्धन किया जाता है तो इसे उपसंवर्धन या दिवतीयक संवर्धन कहा जाता है।
- 4. **जनक ऊतक** प्राथमिक संवर्धन हेतु मूल कोशिका को प्रदान करने वाला ऊतक जनक ऊतक कहलाता है ।
- 5. **कोशिका शृंखला -** मूल कोशिका के द्वारा संवर्धन करके उत्पन्न किये गये संतित कोशिकाओं के समूह को कोशिका शृंखला कहा जाता है।
- 6. **सतत् कोशिका शृंखला-** जब प्राथमिक संवर्धन से प्राप्त उपसंवर्धन की कोशिकाएं अनेक बार विभाजन करने के पश्चात् (संवर्धन) भी जीवित रहते हैं तो इसे सतत् कोशिका श्रृंखला कहा जाता है।
- 7. **असतत् कोशिका शृंखला -** उपसंवर्धन की कोशिकाएं कुछ ही विभाजन करने के पश्चात् निष्क्रिय हो जाती हैं इसे असतत संवर्धन कहा जाता है ।
- 8. **स्पर्श संदमन-** कोशिका संवर्धन के दौरान जब एक कोशिका स्तर का कोई भाग किसी अन्य सतह या कोई अन्य स्तर को स्पर्श करता है तो उस सतह पर संवर्धन द्वारा होने वाली वृद्धि रूक जाती है उसे स्पर्श संवर्धन कहते हैं।
- 9. **केरियोटाइप-** किसी जीव के कुल गुणसूत्र संख्या एवं लिंग गुणसूत्रों के विन्यास या सूत्र को केरियोटाइप कहा जाता है।
- 10. **संवर्धन माध्यम-** कोशिकाओं के संवर्धन हेतु आवश्यक पोषक तत्व एवं अनुकूल परिस्थितियां उपलब्ध करवाने वाले तंत्र को संवर्धन माध्यम कहा जाता है।
- 11. **प्राकृतिक माध्यम** कोशिका संवर्धन हेतु आवश्यक पोषक तत्वों से युक्त जैविक पदार्थ जैसे प्लाज्मा, जैविक द्रव, ऊतकीय निष्कर्ष इत्यादि प्राकृतिक माध्यम की भूमिका निभाने में सक्षम होते हैं।
- 12. **कृत्रिम माध्यम-** कोशिकाओं के संवर्धन हेतु पोषक तत्वों से युक्त कृत्रिम रासायनिक तंत्र जैसे अर्ल का विलयन, हैन्क विलयन, डल्बेको विलयन इत्यादि कृत्रिम माध्यम कहलाते हैं।
- 13. **निलम्बन कोशिकाएं-** ऐसी कोशिकाएं जिन्हें संवर्धन हेतु किसी ठोस सतह से चिपके रहने की आवश्यकता नहीं होती है अर्थात् इनके संवर्धन को तरल पोषक माध्यम में ही संवर्धन करने की क्षमता होती है ।
- 14. **एकल स्तर संवर्धन-** जब कोशिकाएं संवर्धन के दौरान एक ही स्तर में व्यवस्थित हो जाएं तो ऐसे संवर्धनी को एकल स्तरीय संवर्धन कहा जाता है । इनको संवर्धन के लिये किसी सतह की आवश्यकता होती है ।
- 15. **स्टेम कोशिकाएं-** पूर्वगामी या आदि कोशिका जो विभाजन करके अन्ततः विभेदित कोशिकाओं को उत्पन्न करती है ।
- 16. **अविभेदित कोशिकाएं** ऐसी आदि कोशिकाएं जिनमें विभेदन सुनिश्चित हो चुका है किन्तु स्वयं अभी तक विभेदित नहीं हुई हैं।

- 17. **परिपक्व विभेदित कोशिकाएं-** ऐसी विकसित कोशिकाएं जिनमें किसी विशेष कार्य को क्रियान्वित
- करने हेत् संरचनात्मक एवं कार्यिकीय स्तर पर रूपान्तरण होता है । ये विभाजन नहीं करती हैं ।
- 18. **हेफ्लिक प्रतिबन्ध-** कोशिकाओं के संवर्धन के दौरान प्रजाति विशेष के गुणों के अनुरूप विभाजनों की संख्या निश्चित रहने की प्रवृति को हेपिलक प्रतिबन्ध कहा जाता है।
- 19. **ग्लिया कोशिकाएं** तंत्रिका तंत्र में पाए जाने वाले तंत्रिका कोशिकाओं के पोषण, सुरक्षा एवं रखरखाव करने वाली पोषक कोशिकाओं को ग्लिया कोशिकाएं कहा जाता है।
- 20. **हे. ला. कोशिकाएं** हेनरिटा लैक्स नाम स्त्री के गर्भाशय के कंठ क्षेत्र में विकसित कार्सिनोमा के ऊतको से प्राप्त कोशिकाओं से उत्पन्न सतत कोशिका लाइन्स जिसका उपयोग कोशिकाओं एवं विषाण् की वृद्धि प्रक्रिया का अध्ययन करने के लिये किया गया है।
- 21. **फाइब्रोब्लास्ट-** संयोजी उत्तक को उत्पन्न करने वाली कोशिकाओं जो कोलेजन एवं इलास्टिन इत्यादि का निर्माण करती हैं (डेस्मोसाइट, फाइब्रोसाइट) ।
- 22. **प्लेटलेट जिनत वृद्धि कारक (पी.डी.जी.एफ)** यह कारक प्लेटलेट, मैक्रोफेज भक्षक कोशिका एवं एण्डोथीलियल कोशिकाओं द्वारा स्त्रावित किया जाता है तथा यह कारक घाव को ठीक करने एवं रक्तीय वाहिकाओं के अरेखांकित मांसपेशियों को सिक्रय बनाता है।
- 23. रूपांतरक एवं वृद्धि कारक(टी जी एफ)- सिक्रिय लसीका कोशिकाएं. प्लेटलेट, भक्षक मेक्रोफेज एवं कुछ कायिक कोशिकाओं द्वारा स्त्रावित कारक जो मेक्रोफेज एवं लसीका कोशिकाओं की सिक्रियता के संदमन 1gA प्रतिरक्षी हेतु उत्तेजक एवं फाइब्रोब्लास्ट के विभाजन को प्रेरित करने एवं घाव को ठीक करने में सहायक होता है।
- 24. **अधिचर्मी वृद्धि कारक (ई जी एफ)** विशेष अमीनो अम्ल, पॉलीपेप्टाइड जो विभिन्न कोशिकाओं जैसे त्वचा के किरेटिनोसाइट्स की वृद्धि को प्रेरित करता है।
- 25. **सीरम-** रूधिर का तरल भाग जो रक्त का थक्का बनाने के बाद हल्के पीले रंग के द्रव के रूप में पेश रह जाता है । इसमें थक्के के लिये आवश्यक फाइब्रिनोजन कारक नहीं होता है ।
- 26. **एल्युमिन-** रूधिर का प्रमुख प्रोटीन जो सीरम में भी पाया जाता है ।
- 27. ट्रान्सफेरिन- रूधिर का प्रोटीन जो रक्त में लौह के स्थानांतरण में आवश्यक होता है ।

6.8 संदर्भ ग्रंथ (Reference Books):

- Freshney, R.I. (ed.) (1992). "Animal Cell Culture: A Practical Approach (2nded.)". Oxford University Press, Oxford.
- 2. Paul, j. (1975). (1975). "Cell and Tissue Culture (5thed.)" Livingstone Edinburgh. U.K.
- 3. Bulock, J.D. and Kristiansen, B (eds.) 1987. "Basic Biotechnology". Academic Press, New York.

6.9 बोध प्रश्न :

1. प्राथमिक संवर्धन क्यों किया जाता है?

- 2. उप संवर्धन क्यों आवश्यक हैं?
- 3. कोशिका श्रृंखला की आवश्यकता क्यों पड़ती है?
- 4. कोशिका संवर्धन में माध्यम से क्या अभिप्राय है?
- 5. कोशिका संवर्धन हेतु सीरम को उपयुक्त क्यों माना जाता है ?

6.10 अभ्यासार्थ प्रश्नः

- 1. प्राथमिक कोशिका संवर्धन क्या है? द्वितीयक संवर्धन से यह किस प्रकार से भिन्न है?
- 2. सतत् कोशिका श्रृंखला (लाइन) को परिभाषित कीजिए । परिमित या सीमित कोशिका श्रृंखला से इसकी तुलना कीजिये ।
- 3. निम्नलिखित पर विस्तार से टिप्पणी लिखिये.
 - (i) यांत्रिकीय पृथक्करण
 - (ii) कोशिकाओं का किण्वकों द्वारा पृथक्करण
 - (iii) जीवनक्षम एवं जीवनअक्षम कोशिकाओं का पृथक्करण
- 4. कोशिका संवर्धन हेत् विभिन्न प्रकार के माध्यमों का वर्णन कीजिये।
- 5. निम्नलिखित पर संक्षेप में लिखिये -
 - (i) सीरम युक्त माध्यम
 - (ii) सीरम रहित माध्यम
 - (iii) रासायनिक माध्यम
- 6. कोशिका लाइन में पाई जाने वाले प्रकार की कोशिकाओं पर टिप्पणी लिखिये।
- 7. निम्निलिखित कोशिका- लाइनों में से सतत एवं सीमित प्रकार की लाईनों को पृथक कीजिये। MRC 5, CHOK 1, HeLa, W-138, BHK 21, IMR-90
- 8. सीरम रहित माध्यम के अवगुण या कमियों का उल्लेख कीजिये ।
- 9. सीरम युक्त माध्यम के लाभ एवं दोषों पर प्रकाश डालिये ।

इकाई - 7

ऊतक एवं अंग संवर्धन की तकनीक एवं अनुप्रयोग । ऊतक अभियान्त्रिकी के बारे में प्राथमिक जानकारी । TISSUE AND ORGAN CULTURE TECHNIQUES, APPLICATION. ELEMENTARY IDEA ABOUT TISSUE ENGINEERING

इकाई की रूपरेखा

- 7.0 उद्देश्य
- 7.1 प्रस्तावना
- 7.2 ऊतक संवर्धन
 - 7.2.1 स्लाइड संवर्धन विधियाँ
 - 7.2.1.1 एकल कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि
 - 7.2.1.2 मेक्सिमोव दोहरी कवर स्लिपप्लाज्मा स्कंदन विधि
 - 7.2.2 केरेल फलास्क तकनीक
 - 7.2.3 परखनली संवर्धन तकनीक
 - 7.3 ऊतक सवंधन के अनुप्रयोग
- 7.4 अंग संवर्धन
- 7.5 अंग संवर्धन की तकनीक
 - 7.5.1 अगार-जेल विधि
 - 7.5.2 रॉफ्ट विधि
 - 7.5.3 वॉच ग्लास विधिएमए
 - 7.5.4 ग्रिड विधि
 - 7.5.4 चक्रीय उदभासक विधि
- 7.6 अंग सर्वर्धन के अनुप्रयोग
- 7.7 ऊतक अभियान्त्रिकी
- 7.8 सारांश
- 7.9 शब्दावली
- 7.10 संदर्भ ग्रंथ
- 7.11 बोध प्रश्न
- 7.12 अभ्यासार्थ प्रश्न

7.0 उद्देश्य:

उतक सवंधन का तात्पर्य है किसी उतक को विशेष माध्यम में विकसित करके उसकी सहायता से उतकों को संवर्धन माध्यम से जीवित बनाये रखना । जिस प्रकार उतक में विभेदित कोशिकाएँ होती हैं उसी प्रकार अंग में भी विभिन्न उतकों का समूह होता है । इन विटो तंत्र में जब उतक या अंग को संवर्धित किया जाता है तो विभिन्न वृद्धि कारक पदार्थों को अनुपूरक के रूप में प्रयोग में लिया जाता है साथ ही इस बात का ध्यान रखा जाता है कि उतक या अंग को एक सुगम अधःस्तर मिल सके । इस इकाई का उद्देश्य उतक व अंग संवर्धन की विभिन्न तकनीकों की जानकारी प्रदान करना है ।

इस इकाई में हम निम्नांकित बिन्द्ओं का अध्ययन करेंगे तथा यह ज्ञान अर्जित करेंगे कि -

- (1) ऊतक व अंग संवर्धन के समय किन-किन सावधानियों का ध्यान रखना चाहिए ।
- (2) ऊतक व अंग सर्वर्धन तकनीक के मानव जीवन के लिये क्या-क्या महत्वपूर्ण उपयोग है।

7.1 प्रस्तावनाः

अंग संवर्धन प्रक्रिया प्राकृतिक रुप से विज्ञान की भौतिक व जीवविज्ञान शाखा से विकसित हुई है। सन् 1880 में आरनोल्ड (Arnold) ने ल्यूकोसाइट कोशिकाओं को शरीर के बाहर संवर्धन करने का प्रयास किया। सन् 1885 में विलहेल्म रुक्स (Wilheln Roux's) ने भ्रूण की मध्यांश को गर्म सेलाइन में कुछ दिनों के लिए रखकर उसको विकसित किया। सन् 1903 में जॉली नामक वैज्ञानिक ने सर्वप्रथम कोशिका जीववता तथा कोशिका विभाजन का इन विट्रो प्रेक्षण कर अध्ययन किया।

सन् 1907 में हेरिसन (Harrison) नामक वैज्ञानिक ने मेंढक भ्रूण के मध्यांश निलका भाग के छोटे-छोटे टुकडों को मेंढक था स्कंद पर जीवित रखा । निर्जर्मीकृत अवस्था में रखने पर यह खण्ड कुछ सप्ताह तक जीवित रहे तथा इनमें विभेदन भी प्रारम्भ हुआ । बरोर (Burrowr) नामक वैज्ञानिक ने लिम्फ़ स्कंद के स्थान पर प्लाज्मा स्कंद का प्रयोग किया ।

केरेल (Carrel) नामक वैज्ञानिक ने बताया कि भ्रूण अर्क में कुछ निश्चित कोशिकाओं की वृद्धि करने की अधिक क्षमता पाई जाती है । जिसके बाद ऊतक संवर्धन में प्लाज्मा स्कंद के स्थान पर भ्रूण अर्क का अधिकाधिक प्रयोग किया जाने लगा ।

ऊतक संवर्धन में महत्वपूर्ण किठनाई जो देखी गई वो थी जीवाण्वीय संदूषण । संदूषण रिहत वातावरण तथा निर्जमीकृत अवस्थाओं के प्रयोग द्वारा ऊतक संवर्धन को सफलतापूर्वक प्राप्त किया जा सकता है । ऊतक व अंग संवर्धम में जो तकनीकियों है वो मूलतः कोशिका संवर्धन जैसी ही हैं परन्तु मुख्य अंतर यह है कि इन तकनीकियों में अधःस्तर व वातावरण को नम बनाये रखने का विशेष ध्यान रखा जाता है ।

7.2 ऊतक सवंधन :

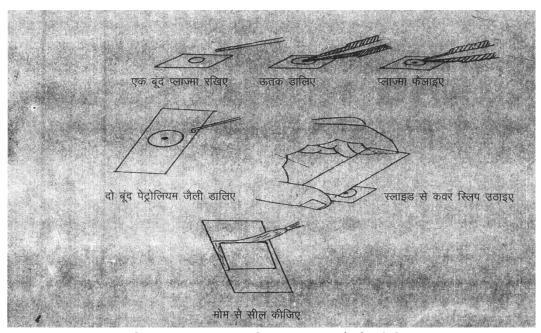
ऊतक संवर्धन से अभिप्रायः है बिना कोशिकाओं में विखंडित किए हुए ऊतक को संवर्धन माध्यम में जीवित रखना अर्थात वह अध्ययन जिसमें कोशिकाएँ अपना संगठन उसी प्रकार बनाए रखती है जिस प्रकार की वे शरीर में होती है इस प्रकार के अध्ययन की आवश्यकता तब पड़ती है जबिक किसी पदार्थ के कोशिका के स्थान पर ऊतक पर पड़ने वाले प्रभाव का अध्ययन किया जाता है, उदाहरणार्थ उपकला ऊतक के अंदर विभिन्न उपकला कोशिकाएँ बंधो द्वारा बंधी रहती हैं तथा एक समन्यवय स्थापित करती है। यदि कोई रसायन कोशिका- कोशिका बंधो को प्रभावीत करता है तो ऐसे रसायन के प्रभाव का उपकला ऊतक पर सुगमता से अध्ययन किया जा सकता है। जैसे कि ग्रंथी ऊतक किसी विशिष्ट परिस्थिति में संवर्धन माध्यम में स्त्रावण की प्रकिया इन वीवो तंत्र जैसी ही करती है या अलग प्रकार से करती है आदि का भी अध्ययन ऊतक संवर्धन द्वारा किया जा सकता

किस पात्र में ऊतक का संवर्धन किया जाना है उसके आधार पर ऊतक संवर्धन की निम्न विधियों हैं

- 1. स्लाइड संवर्धन विधि
 - (i) एकल कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि
 - (ii) मेक्सिमोव की दोहरी कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि
- 2. केरेल फ्लास्क तकनीक
- 3. परखनली संवर्धन तकनीक
- 7.2.1 स्लाइड संवर्धन विधियाँ: जब ऊतक के छोटे हिस्से का संवर्धन कराना होता है तो इस विधि को काम में लिया जाता है । इस विधि में ऊतक का संवर्धन उल्टी कवर स्लिप पर किया जाता है । यह संवर्धन विधि आसान व कम खर्चीली होती है । इसमें ऊतक का आसानी से स्क्ष्मदर्शी द्वारा अध्ययन किया जा सकता है । चूंकि कोशिका कवर स्लिप पर वृद्धि करती हैं इसलिए ऊतक को आसानी से अभिरंजित व स्थाईकरण भी किया जा सकता है । ऊतक का संवर्धन स्लाइड पर दो प्रकार से किया जाता है ।

7.2.1.1 एकल कवर स्लिप प्लाज्मा संवर्धन विधि-

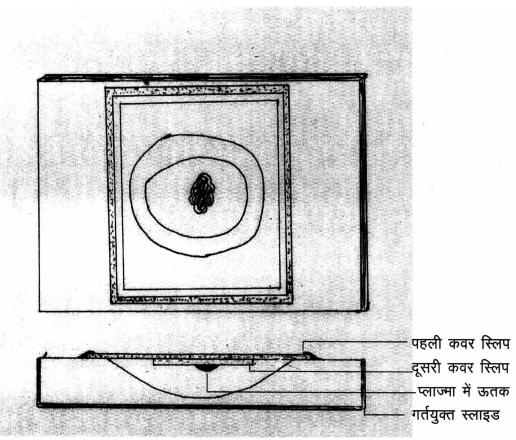
इस विधि में केपेलरी पिपेट द्वारा कवर स्लिप के मध्य में प्लाज्मा विलयन की एक बूंद डाली जाती है। इस प्लाज्मा विलयन में सावधानी से विच्छेदित ऊतक के टुकड़े को चिमटी की सहायता से रखा जाता है। इसमें अब भ्रूणीय सत विलयन की एक बूंद डाल कर मिलाया जाता है। इस विलयन को अब स्प्रेडर की सहायता से लगभग 15 से 20 मिमी क्षेत्र में फैला दिया जाता है। अब एक खड़ढे युक्त स्लाइड पर पेट्रोलियम की जैली की सहायता से कवर स्लिप को व्यवस्थित कर दिया जाता है व पेराफिन मोम द्वारा कवर स्लिप के किनारे को सील कर दिया जाता है। इस स्लाइड को 37 डिग्री तापक्रम पर इनक्यूबेट किया जाता है (चित्र 7.1)



चित्र 7.1 एकल कवर स्लिप प्लाज्मा संवर्धन विधि

7.2.1.2 मेक्सिमोव दोहरी कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि-

यह विधि भी लगभग एकल कवर स्लिप के समान होती हैं । इस विधि में दो कवर स्लिप ली जाती हैं । एक वर्गाकार बड़ी कवर स्लिप होती है जबिक दूसरी गोल व छोटी कवर स्लिप होती है । पहली बड़ी वर्गाकार कवर स्लिप पर एक बूंद संतुलित लवण विलयन (BBS) की डाली जाती है । इस कवर स्लिप पर छोटी गोल कवर स्लिप को रखा जाता है । यह संतुलित लवण विलयन के पृष्ठ तनाव द्वारा चिपक जाती है । आगे की विधि एकल कवर स्लिप संवर्धन विधि के समान दोहराई जाती है । इसमें छोटी गोलाकार कवर स्लिप पर प्लाज्मा विलयन की एक बूंद डाली जाती है । इस प्लाज्मा विलयन में सावधानी से विच्छेदित ऊतक के टुकड़े को चिमटी की सहायता से रखा जाता है । अब भ्र्णीय सत विलयन की एक बूंद डाल कर मिलाया जाता है । अब स्प्रेडर की सहायता से लगभग 15 से 20 मिमी क्षेत्र में फैला दिया जाता है ।अब एक खड़ढे युक्त स्लाइड पर पेट्रोलियम की जैली की सहायता से कवर स्लिप को व्यवस्थित कर दिया जाता है व पेराफिन मोम द्वारा कवर स्लिप के किनारे को सील कर दिया जाता है । इस स्लाइड को 37 डिग्री तापक्रम पर इनक्यूबेट किया जाता है ।

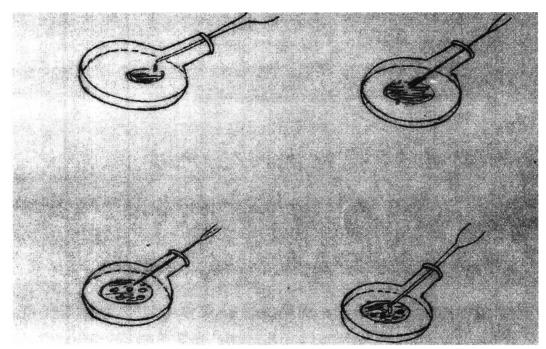


चित्र 7.2 दोहरी कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि

7.2.2 केरेल फलास्क तकनीक -

इस विधि में ऊतक का संवर्धन एक विशेष केरेल फ्लास्क में किया जाता है । यह 30 एस का पॉलीस्टाइरीन फ्लास्क होता है जो कि फॉलकन प्लास्टिक का बना होता है । इसकी गर्दन छोटी व फ्लास्क चपटा होता है । इस फ्लास्क में ऊतक संवर्धन के लिए पहले प्लाज्मा को पिपेट की सहायता से फ्लास्क में डालकर स्प्रेडर की सहायता से फैलाया जाता है । अब एक्सप्लॉट को इस प्लाज्मा के ऊपर व्यवस्थित किया जाता है । प्लाज्मा स्कंदन के बाद फ्लास्क मे, संवर्धन माध्यम को डाला जाता है । इस विधि के निम्न फायदे

- 1. इस विधि दवारा ऊतक को लम्बे समय तक संरक्षित रखा जा सकता है।
- 2. अधिक मात्रा में उतक का संवर्धन किया जा सकता है।
- 3. फ्लास्क संवर्धन में गैस अवस्था को आसानी से नियंत्रित किया जा सकता है।
- 4. संवर्धन माध्यम का भी आसानी से मात्रात्मक अध्ययन किया जा सकता है।

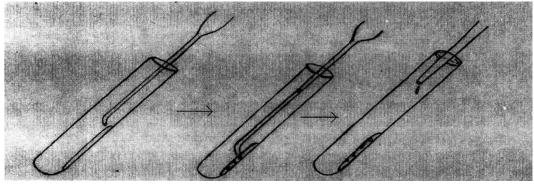


चित्र 7.3 केरेल फ्लास्क विधि

7.2.3 परखनली संवर्धन तकनीक -

यह विधि केरेल फ्लास्क विधि के समान है इसमें ऊतक का संवर्धन फ्लास्क के स्थान पर परखनली में किया जाता है । सर्वप्रथम प्लाज्मा की एक बूंद को स्प्रेडर की सहायता से परखनली की सतह पर तिरछा करके फैलाया जाता है । इस फैले हुए प्लाज्मा में एक्सप्लांट को व्यवस्थित किया जाता है । स्कंदन होने के बाद संवर्धन माध्यम को डाला जाता है । इस परखनली को स्थिर रैक्स या रोलर ड्रम में इनक्यूबेट किया जाता है । यह ऊतक संवर्धन के लिए सस्ती व आसान विधि है । इस विधि द्वारा अधिक मात्रा में ऊतक संवर्धन किया जा सकता है । इस विधि की कुछ हानियाँ भी हैं ।

- 1. परखनली की ऑप्टीकल अवस्था अच्छी नहीं होती।
- 2. परखनली छोटी होने के कारण इनके मात्रात्मक अध्ययन में कठिनाई होती है।
- 3. इस विधि में संदूषण की संभावना रहती हैं।



चित्र 7.4 परखनली संवर्धन तकनीक\

7.3 ऊतक संवर्धन के अन्प्रयोग:

ऊतक संवर्धन द्वारा विभिन्न जैव रासायनिक व कार्यकीय अभिक्रियाएँ जो कि ऊतकों द्वारा की जाती है उनकी क्रिया विधि का ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा अध्ययन किया जाता है। यदि कोई ऊतक ग्रंथि के रूप में उपस्थित होता है तथा किन्ही विशिष्ट परिस्थितियों में वह किसी एन्जाइम या हार्मोन का इन विट्रो तंत्र में निर्माण करता है तो चिकित्सा क्षेत्र में यह अत्यन्त उपयोगी होता है। उदाहरणार्थ थाइराइड ग्रंथि के फॉलीकल को यदि संवर्धन माध्यम में किसी प्रकार से थाइरॉक्सीन निर्माण के लिए प्रेरित किया जाता है तो यह थाइराइड ग्रंथि से सम्बंधित रोगों के उपचार की प्रभावशाली विधि हो सकती हैं। इसी प्रकार से उपकला कोशिकाओं को उपकला ऊतक के रूप में संवर्धन व उसकी वृद्धि द्वारा त्वचा का निर्माण किया जा सकता है। सारांश में हम यह कह सकते हैं कि ऊतक संवर्धन जैव चिकित्सकीय क्षेत्र की एक महत्वपूर्ण तकनीक है।

7.4 अंग संवर्धन:

कृत्रिम रूप से पात्र में किसी अंग अथवा इसके किसी हिस्से की वृद्धि एवं संवर्धन जिसमें ऊतक के विभिन्न घटकों का संख्यात्मक एवं क्रियात्मक दृष्टि से होने वाला परिरक्षण अंग संवर्धन कहलाता है । इस प्रकार के सवंधन में वृद्धि नवीन विभेदित संरचनाओं के रूप में होती है जैसे ग्रन्धियों में ग्रन्थिल संरचनाओं के रूप में फेफडों में ब्रोकस के रूप में । अंग संवर्धन के दौरान अंग की कार्य प्रणाली में कोई परिवर्तन नहीं होता ।

7.5 अंग संवर्धन की तकनीक:

लॉयब नामक वैज्ञानिक ने सर्वप्रथम सत्र 1897 में परखनिलयों में यकृत, वृक्क, अण्डाशय तथा विभिन्न अंगों को संवर्धित माध्यम में रखा तथा पाया कि ये अंग तीन दिनों तक संवर्धित माध्यम में जीवित रहे । इन्होंने देखा कि इस संवर्धन के दौरान संवर्धन पात्र में ऑक्सीजन की प्रचुर मात्रा लगातार मिलती रहनी चाहिए ताकि परिवर्धित अंगों में ऊतक क्षय नहीं हो । आजकल अंग संवर्धन के लिये अनेक प्रकार के संवर्धन माध्यमों तथा संवर्धन तकनीकों का उपयोग किया जाता है जिनमें से कुछ प्रमुख विधियां निम्न है:-

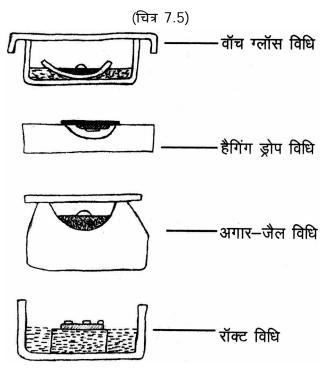
7.5.1 अगार -जैल विधि- इस विधि में एक्सप्लान्ट संवर्धन माध्यम में इ्बा हुआ नहीं होता है जिसके कारण यह माध्यम में उपस्थित पोषकों का आसानी से उपयोग कर लेता है । इसमें संवर्धन माध्यम में लवण विलयन सीरम, अमीनो अम्ल, विटामिन्स, चूजे के आ का सार तथा 1 प्रतिशत अगार मिला होता है । इस संवर्धन माध्यम में लगभग 5- 7 दिनों के पश्चात् परिवर्तित किया जाता है । इस विधि की सहायता से अंगों में होने वाले परिवर्तनों को सूक्ष्मदर्शों की सहायता से अध्ययन किया जा सकता है । जिसके लिये भ्रूणीय वाँच ग्लास का प्रयोग किया जाता है जिसे पैराफिन वैक्स के द्वारा वायुरोधी किया जाता है । (चित्र 75)

7.5.2 रॉफ्ट विधि-अगार जैल विधि में अंग अधःस्तर के सीधे संपर्क में रहता है तथा इस भाग को ऑक्सीजन प्रचुर मात्रा में नहीं मिल पाती है अतः लैन्स पेपर या रेयान ऐसिटेट द्वारा निर्मित विशेष जालीनुमा अधःस्तर को रॉफ्ट कहते हैं जिस पर कि अंग रखा जाता है । रॉफ्ट तथा उसपर

रखा हु आ अंग वॉचग्लास में सीरम के ऊपर तैरता रहता है। इस सम्पूर्ण अंग संवर्धन पात्र को पेट्रोलियम जैली या वैक्स से सील कर दिया जाता है। एक रॉफ्ट पर मुख्यतया चार या चार से अधिक एक्सप्लान्ट को एक साथ प्रयुक्त कर सकते है। (चित्र 7.5)

7.5.3 वॉच ग्लास विधि-इस विधि में कर्तातक (Explant) का सवंधन किसी स्कंद की सतह पर किया जाता है । यह स्कंद चूजे का प्लाज्मा या चूजों के ऊतकों का सार होता है और इस माध्यम को वॉच ग्लास में रखा जाता है । इसिलये इसे वॉच ग्लास विधि कहा जाता है ।यह सबसे पुरानी विधि है । जिसमें संवर्धन के दौरान वॉच ग्लास को निर्जमित परिस्थितियों में रखा जाता है । इस विधि के द्वारा सवंधन अंगों पर विटामिन्स तथा अन्य कार्सिनोजन्स के द्वारा होने वाले प्रभावों का अध्ययन किया जाता है । इसकी सहायता से भ्रूणीय अंगों में आकार निर्माण (Pattern formation) का अध्ययन भी किया जाता है । इस विधि की सबसे बड़ी विशेषता यह है कि यह विधि सबसे सस्ती तथा साधारण सूक्ष्मदर्शी की सहायता से प्रेक्षित की जा सकती है । लेकिन इस संवर्धन के दौरान क्लॉट तरलभूत हो जाता है जिससे कर्तातक आंशिक रूप से या पूर्णरूप से माध्यम में टूट जाता है । (चित्र 7.5)

7.5.4 ग्रिंड विधि- इस विधि को सबसे पहले हावेल नामक वैज्ञानिक ने बताया । इस विधि में 25 वर्ग मि.मी. युक्त तार की जालियां होती है जिसके चारों किनारे मुझे हुए हाते है जो कि टांगों के रूप में काम आते हे । इन जालियों पर सामान्यतया सख्त ऊतकों का संवर्धन किया जाता है । इस ग्रिंड को संवर्धन पात्र में रखा जाता है जिसमें संवर्धन माध्यम को ग्रिंड की ऊँचाई तक भरा जाता है । संवर्धन में ऑक्सीजन तथा Co_2 की उचित सान्द्रता को बनाये रखा जाता है । (चित्र 7.5)



7.5.4 चक्रीय उद्धासन विधि: इस विधि का प्रयोग उन अंगों के संवर्धन में किया जाता है जो कि लम्बे समय तक के लिये संवर्धित किये जाने होते है । इसके लिये कर्तीतक (एक्सप्लांट) को तरल माध्यम तथा गैस प्रावस्था के साथ नियमित समयान्तराल से सम्पर्क में लाया जाता है ।

एक पेट्रीडिश में कर्तीतक की संख्या 2-18 तक हो सकती है तथा इस सम्पूर्ण चेम्बर को एक स्वचालित मशीन से जोड दिया जाता है । जिसकी आवृति प्रति मिनिट या प्रति सेंकेंड के हिसाब से समायोजित की जा सकती है ।

7.6 अंग संवर्धन के अनुप्रयोग:

अंग संवर्धन के निम्नलिखित अन्प्रयोग है :-

- (1) अंग-संवर्धन के द्वारा वृद्धि, विभेदन तथा परिवर्धन के प्रतिरूप का अध्ययन किया जा सकता है।
- (2) अंगों पर विभिन्न हार्मोनों, विटामिन्स तथा केंसर पैदा करने वाले कारकों व उससे होने वाले प्रभावों का अध्ययन इस विधि दवारा आसानी से किया जा सकता है।
- (3) ऊतक इंजीनियरिंग के द्वारा ऊतकों का निर्माण किया जा सकता है । आजकल कृत्रिम रूप से त्वचा का निर्माण संभव है । जो कि त्वचा के जलने या प्लास्टिक सर्जरी में काम में आती है ।
- (4) कृत्रिम त्वचा के प्रत्यारोपण के पांच वर्ष पश्चात् यह सामान्य त्वचा के लक्षणों को उपार्जित कर लेती है।
- (5) अंग सवंर्धन विधि द्वारा लेंगरहैन्स की बीटा कोशिकाओं का संश्लेषण किया जा सकता है जो कि इन्सुलिन का उत्पादन बंद कर देती है जिन्हें अग्नाशय में प्रत्यारोपित कर मधुमेह नामक बीमारी को ठीक करने में काम लिया जाता है इस विधि को ऊतक अभियांत्रिकी कहते हैं।
- (6) अंग संवर्धन द्वारा प्राप्त एक्सप्लान्ट, संरचना तथा कार्यात्मक रूप से समान होते है ।
- (7) अंग संवर्धन तकनीक की सहायता से अंग संवर्धन में वृद्धि के प्रकार, विभेदन तथा इसके विकास से तथा इसको प्रभावित करने वाले कारकों का आसानी से अध्ययन किया जा सकता है।
- (8) इन विट्रो अंग संवर्धन की सहायता से हम किसी भी प्राणी अंग या ऊतक पर किसी दवाई का प्रभाव, कैंसर उत्पत्ति कारकों आदि का अध्ययन कर सकते हैं ।
- (9) इसका सबसे महत्वपूर्ण कार्य किसी अंग विशेष या ऊतक की उत्पत्ति करके उसे किसी रोगी में

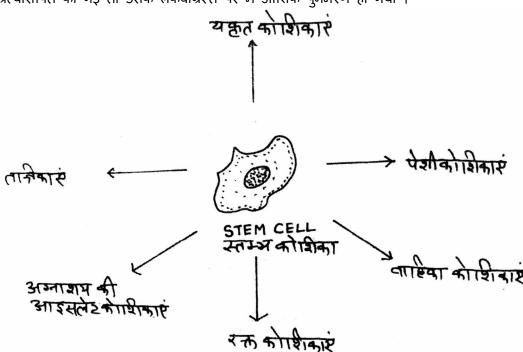
प्रत्यारोपित करना जिसे ऊतक अभियांत्रिकी कहते है । प्राणी त्वचा का उत्पादन आसानी से किया जा रहा है जो कि घावों या (मले हुए प्राणियों में प्रत्यारोपित करने के काम आ रही है ।

7.7 ऊतक अभियांत्रिकी :

ऊतक अभियांत्रिकी जीव विज्ञान, चिकित्सा विज्ञान तथा अभियांत्रिकी से बना वह विशेष ज्ञान है जिसके द्वारा किन्ही कारणों से अंगों व ऊतकों में आई खराबी को नए ऊतक बनाकर उन्हें विक्षिप्त ऊतकों के स्थान पर प्रत्यारोपित कर अंग / ऊतक की पुन: मरम्मत की जा सकती है।

इस विषय के अध्ययन में स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा विभिन्न प्रकार के ऊतकों के निर्माण की जानकारी के पश्चात् तेजी से प्रगति हुई है । ऊतक अभियांत्रिकी में विभिन्न प्रकार के ऊतकों में आई हुई खराबियों के मरम्मत में से कुछ प्रमुख हैं । पहला कैंसर से ग्रसित रोगियों में जिनमें अस्थि मज्जा विकिरण उपचार द्वारा नष्ट हो जाती है उनमें दाता स्तम्भ कोशिकाएं, दाता के अस्थि मज्जा, पेरिफेरल रक्त या नाभिकीय रज्जु के, रक्त से प्राप्त की जाती है । दाता स्तम्भ कोशिकाएं ग्राही में स्वस्थ अस्थि मज्जा का निर्माण करती है ।

स्तम्भ कोशिकाओं के क्षेत्र में हाल में किए गए प्रयोगों से पता चला है कि चूहे की भ्रूणीय स्तम्भ कोशिका से यकृत की कोशिकाएं, मांस पेशी कोशिकाएं, अग्नाश्य कोशिकाएं, रक्त कोशिकाएँ तथा रक्त वाहिनी कोशिकाएँ बन सकती है । एक चूहे में जिसका मेरुरज्जू में हुई क्षिति के कारण पिछले पैरों में लकवा आ गया था ऐसे चूहे के मेरुरज्जू में जब सिरिंज द्वारा स्तम्भ कोशिकाएं प्रत्यारोपित की गई तो उसके लकवाग्रस्त पैर में आशिक पुर्नभरण हो गया ।



चित्र 7.6 स्तम्भ कोशिका से विभिन्न कोशिकाओं की उपस्थिति



चित्र 7.7 रोगी चूहे में स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा उपचार

इन प्रयोगों की सफलता से ऊतक अभियांत्रिकी के क्षेत्र में एक नई आशा का संचार हुआ जिसके अंतगर्त हम निम्न प्रमुख क्षतिग्रस्त रोगों का उपचार कर पाएंगे।

- मस्तिष्क से संबंधित एल्जाइमर एवं पार्किसंस
- मेरुरज्जू एवं उससे संबंधित लकवा ग्राही रोग
- मधुमेह
- हद्यपेशियों की मरम्मत से हृदय रोग ठीक करना
- यकृत में आई खराबी को सही करना।

इस चिकित्सा क्षेत्र में क्षतिग्रस्त ऊतक का निर्माण या तो रोगी में स्वयं में या बाहर से ऊतक निर्माण कर उसका प्रत्यारोपण करके क्षतिग्रस्त ऊतक को ठीक किया जाता है। ऊतक अभियांत्रिकी के कुछ प्रमुख क्षेत्र निम्नलिखित है।

- 1. जैव पदार्थ :- ये सजीवों से प्राप्त पदार्थ होते है जो कि उन पर वृद्धि कर रही कोशिकाओं को व्यवस्थित व निर्मित करने के लिए रचनात्मक आधार प्रदान करते है।
- 2. कोशिकाएं :- ऊतक अभियांत्रिकी में प्रमुख भूमिका कोशिकाओं की होती है ।ये मुख्यता ऊतक में निहित अविभेदित कोशिकाएं या स्तंभ कोशिकाएँ होती है जो उन्हें ऊतकों से विभेदित करती है एवं क्षतिग्रस्त ऊतकों का प्रतिस्थापन तैयार करती है ।
- 3. जैव आधारीय अणु:-ये कुछ ऐसे कारक हैं जो कि कोशिकाओं के ऊतकों में विभेदन के समय वृद्धि व विभेदनकारी कारकों के रुप में उपयोगी होते हैं । कुछ कारक जैसे एन्जीओजैनिक जो कि रक्त वाहिनियों के जालिका निर्माण में मदद करती है ।
- 4. अभियांत्रिकी दिशा: ऊतक अभियांत्रिकी में एक सही ऊतक विभेदन की दिशा की आवश्यकता होती है जो कि विभेदित हो रही कोशिकाओं 'को क्षतिग्रस्त कोशिकाओं या अंग का सामान्य स्वरुप प्रदान कर सके ।
- 5. **जैव यांत्रिकी के आयाम:-** ऊतक अभियांत्रिकी के समय निर्माणाधीन ऊतक में आवश्यक यांत्रिक शक्ति निहित होनी चाहिए जिससे कि प्रतिस्थापित ऊतक मूल ऊतक का स्वरुप ले सकें।
- 6. **उतकों की कोशिकाओं के द्वारा निश्चित सूचना जिनत कार्यप्रणाली :-** उतक अभियांत्रिकी के समय इस बात का विशेष ध्यान रखा जाता है कि कोशिकाओं में निहित जीन अभिव्यक्ति उसी प्रकार की हो जैसे कि सामान्य कोशिकाएं अभिव्यक्त करती है जिससे की क्षतिग्रस्त अंग अभियांत्रिकी दवारा सामान्य कार्य प्रणाली कर सकें।

7.8 सारांश:

ऊतक सवंर्धन का तात्पर्य है किसी ऊतक को विशेष माध्यम में विकसित करके उसकी सहायता से ऊतकों को संवर्धन माध्यम से जीवित बनाये रखना ।िकस पात्र में ऊतक का संवर्धन किया जाना है उसके आधार पर ऊतक संवर्धन की निम्न विधियाँ हैं 1 स्लाइड संवर्धन विधि, ये दो विधियाँ हैं (i) एकल कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि तथा (ii) मेक्सिमोव की दोहरी कवर स्लिप प्लाज्मा स्कंदन विधि । 2 केरेल फलास्क तकनीक 3 परखनली संवर्धन तकनीक ऊतक संवर्धन द्वारा विभिन्न जैव रासायनिक व कार्यकीय अभिकियाएं जो कि ऊतकों द्वारा की जाती है उनकी क्रिया विधि का ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा अध्ययन किया जाता है ।कृत्रिम रूप से पात्र

में किसी अंग अथवा इसके किसी हिस्से की वृद्धि एवं संवर्धन जिसमें ऊतक के विभिन्न घटकों का संख्यात्मक एवं क्रियात्मक दृष्टि से होने वाला परिरक्षण अंग संवर्धन कहलाता है। अंग संवर्धन की कुछ प्रमुख तकनीक हैं जैसे अगार-जेल विधि रॉफ्ट विधि, वॉच ग्लास विधि, ग्रिड विधि, चक्रीय उदभासक विधि आदि। ऊतक अभियांत्रिकी जीव विज्ञान, चिकित्सा विज्ञान तथा अभियांत्रिकी से बना वह विशेष ज्ञान है जिसके द्वारा किन्ही कारणों. से अंगों व ऊतकों में आई खराबी को नए ऊतक बनाकर उन्हें विक्षिप्त ऊतकों के स्थान पर प्रत्यारोपित कर अंग / ऊतक की पुन: मरम्मत की जा सकती है।

7. शब्दावली :

ऊतक सवंधन -िकसी जीव शरीर से उसके ऊतक भाग को अलग कर संवर्धन माध्यम पर वृद्धि करना, ऊतक संवर्धन कहलाता है

अंग सर्वर्धन. - किसी जीव शरीर से उसके अंग भाग को अलग कर संवर्धन माध्यम पर वृद्धि करना, अंग संवर्धन कहलाता है जो कि एक जटिल प्रक्रिया है ।

ऊतक अभियांत्रिकी -जीव विज्ञान, चिकित्सा विज्ञान तथा अभियांत्रिकी से बना वह विशेष ज्ञान है जिसके द्वारा किन्ही कारणों से अंगों व ऊतकों में आई खराबी को नए ऊतक बनाकर उन्हें विक्षिप्त ऊतकों के स्थान पर प्रत्यारोपित कर अंग / ऊतक की पुन: मरम्मत की जा सकती है।

अगार - यह एक पॉलीसैकेराइड होता है । जो कि माध्यम को ठोस रूप प्रदान करता है ।

7.10 संदर्भ ग्रंथ:

- 1. Paul, J. (1975). "Cell and Tissue Culture (5th ed.)" Livingstone, Edinburgh. U.K.
- 2. Freshney, R.I (2000). "Culture of Animal cells: A manual of basic techniques (IV ed.)". Willey Liss

7.11 बोध प्रश्न:

- 2. ऊतक अभियांत्रिकी द्वाराका निर्माण किया जाता है ।

7.12 अभ्यासार्थ प्रश्न:

- (1) अंग सर्वर्धन प्रक्रिया क्या है । समझाइए?
- (2) अंग संवर्धन की विभिन्न विधियों को समझाइए?
- (3) अंग संवर्धन प्रक्रिया के क्या-क्या अनुप्रयोग है लिखिए
- (4) ऊतक अभियांत्रिकी के बारे में लिखिए?

स्तम्भ कोशिका - परिचय स्तम्भ कोशिकाओ के प्रकार स्तम्भ कोशिकाओं की उपस्थिति । स्तम्भ कोशिकाओं का महत्व एवं अनुप्रयोग ।

STEM CELL - INTRODUCTION. TYPE OF STEM CELLS, OCCURRENCE OF STEM CELLS. SIGNIFICANE, APPLICATION OF STEM CELL.

डकार्ड की रूपरेखा

- 8.0 उद्देश्य
- 8.1 प्रस्तावना
- 8.2 स्तम्भ कोशिकाओं की उपस्थिति एवं प्रकार
 - 8.2.1 हिमेटोपोइटिक स्तंभ कोशिका उत्पादन स्थल
 - 8.2.2 श्क्राण् स्तम्भ कोशिका
 - 8.2.3 हाइड्रा की अंतराली कोशिका
- 8.3 स्तम्भ कोशिकाओं का महत्व
- 8.4 स्तम्भ कोशिकाओं के अन्प्रयोग
- 8.5 सारांश
- 8.6 शब्दावली
- 8.7 सन्दर्भ ग्रन्थ
- 8.8 बोध प्रश्न
- 8.9 अभ्यासार्थ प्रश्न

8.0 उद्देश्य:

इकाई में स्तम्भ कोशिकाओं के बारे में अध्ययन करेंगे । प्राणियों में कई प्रकार की स्तम्भ कोशिकाएँ पाई जाती है जैसे भ्रूणीय स्तम्भ कोशिकाएँ, भ्रूणीय जनन कोशिकाएं, फिटल स्तम्भ कोशिकाएं व वयस्क स्तम्भ कोशिकाएं । यह स्तम्भ कोशिकाएं विभिन्न प्रकार से उपयोग में लाई जाती है जैसे औषधी परीक्षण, रोगों के इलाज आदि ।इस इकाई के अन्तर्गत हम स्तम्भ कोशिकाओं के विषय में जानकारी प्राप्त करेंगे । उदाहरणार्थ-स्तम्भ कोशिकाएँ जीवन के किन-किन समय पर किस-किस स्थान पर उपस्थित होती हैं साथ ही यह स्तम्भ कोशिकाएँ कितने प्रकार की होती हैं । यह इकाई शुक्राणु स्तम्भ कोशिका व हाइड्रा की अंतराली कोशिकाओं के साथ स्तम्भ कोशिकाओं के महत्व एवं उपयोग को भी स्पष्ट करती है ।

8.1 प्रस्तावनाः

कशेरूकी प्राणियों के अधिकांश ऊतक विभेदित कोशिकाओं के बने होते है जो लंबे समय तक विभाजित नहीं होते है । मायोब्लास्ट में तीव्रता से विभाजित होने वाली कोशिकाओं का समूह पाया जाता है । कोशिकाओं का यह समूह मायोट्यूब के विकसित होने तक विद्यमान रहता है । यद्यपि कुछ ऊतकों जैसे एपिडर्मिस, आंत्रिय उपकला एवं रक्त कोशिकाओं में भ्रूणीय प्रकृति की कोशिकाओं का समूह पाया जाता है । हालांकि वयस्क प्राणियों में इन कोशिकाओं का कोशिकीय संगठन निरंतर परिवर्तित होता रहता है ।यह परिघटना स्तनधारियों की RBC में पाई जाती है । प्रत्येक RBC में केन्द्रक अनुपस्थित होता है एवं परिसंचरण के दौरान इसकी जीवनाविध 120 दिन होती है । एक सामान्य व्यक्ति में प्रतिदिन 3x10¹¹ RBC नष्ट होती है एवं इतनी ही संख्या में इनका पुन: निर्माण हो जाता है । इन कोशिकाओं का सतत् निर्माण अस्थिमज्जा में उपस्थित हिमेटोपॉइटिक स्तंभ कोशिकाओं के द्वारा होता है ।



चित्र 8.1 स्तम्भ कोशिका का विभेदन

स्तम्भ कोशिकाओं एवं इसकी रूपान्तरणीय परिघटनाओं के बारे में बहुत कम ज्ञान है जबिक हमारा जीवन इन्हीं कोशिकाओं पर आधारित है । सिमिनोविच (siminovitch-1963) के अनुसार एक स्तम्भ कोशिका वह कोशिका है जिसमें अत्यधिक प्रचुरोद्भवन (proliferation) अन्य स्तम्भ कोशिकाओं का निर्माण करने एवं विभेदित कोशिकाओं का निर्माण करने की क्षमता होती है । अतः एक स्तम्भ कोशिका द्वारा लाखों विभेदित कोशिकाओं एवं कुछ स्तम्भ कोशिकाओं युक्त क्लोन का निर्माण होता है । इस प्रकार स्तम्भ कोशिकाओं में लंबे समय तक सतत् प्रचुरोद्भवन द्वारा ऊतकों की पूर्ववर्ती कोशिकाओं का निर्माण करने की क्षमता होती है ।

सभी प्राणियों में स्तम्भ कोशिकाओं का विभेदित कोशिकाओं में निरंतर रूपान्तरण चलता रहता है। पुनरूद्भवन के दौरान विभेदित कोशिकाएं, भ्रूणीय गुणों युक्त स्तम्भ कोशिकाओं में परिवर्तित हो जाती है। इस घटना को निर्विभेदन (Dedifferntitation) कहते है। निर्विभेदन द्वारा निर्मित ये कोशिकाएं पुनर्विभेदन (Redifferentiation) द्वारा पुनः विभेदित कोशिका में परिवर्तित हो जाती है। किसी भी कोशिका को विभेदित होने से पहले कई प्रावस्थाओं से गुजरना पड़ता है। विभेदन से पहले इसमें सामर्थ्य (competence) का होना आवश्यक है, तािक प्रेरण (Induction) के प्रति अनुक्रिया दिखा सके। इसके पश्चात् इसमें निर्धारण की क्रिया होती है व अंत में ये एक विशिष्ट पथ में विभेदित हो जाती है।

8.2 स्तम्भ कोशिकाओं की उपस्थिति एवं प्रकार

एक प्राणी में निम्न प्रकार की कोशिकाएं उपस्थित हो सकती है।

(1) विभेदित कोशिका (Differentiated cell) - इनके जीन में अनुलेखन एवं mRNA में अनुवादन होता है ।

- (2) **निर्धारित कोशिका (Determined cell)** जीन में संभवतया अनुलेखन नहीं होता है अथवा इन्फोर्मोसोम्स उपस्थित होते है ।
- (3) **सामर्थ्य युक्त कोशिका (Competent Cell)** जीन आशिक रूप में आविरत होता है लेकिन जीन में अनुलेखन नहीं होता है ।
- (4) सामर्थ्य पूर्वी कोशिका (Pre competent Cell) जीन पूर्ण रूप से आवरित रहता है। उपरोक्त कोशिकाओं को विभाजन क्षमता (Division Potency) के आधार पर चार प्रकारों में वर्गीकृत कर सकते है।
- (a) पूर्णशक्त कोशिकाएँ (Totipotent cell) वे कोशिकाएं जिनमें अन्य सभी कोशिकाओं का निर्माण करने की क्षमता होती है । निषेचन द्वारा निर्मित युग्मनज (Zygote) एक पूर्णशक्त कोशिका है जो विभाजन एवं विभेदन द्वारा प्राणी में पाई जाने वाली समस्त कोशिकाओं का निर्माण करता है । युग्मनज में विदलन द्वारा निर्मित प्रथम आठ कोरकखण्डों (Blastomere) को यदि पृथक -कर दिया जाए तो ये पूर्ण विकसित भ्रूण का निर्माण कर सकती है अर्थात् प्रथम तीन विदलन तक कोरकखण्डों में पूर्णशक्तता पाई जाती है
- (b) अनेकक्षम कोशिकाएँ (Pleuripotent cell) इन कोशिकाओं में पूर्णशक्त से थोड़ी कम क्षमता होती है । फिर भी इनसे अनेक प्रकार की कोशिकाओं का निर्माण होता है । जैसे मनुष्य के परिवर्धन के चौथे दिन भ्रूण एक गेंद्र के समान होता है । इस भ्रूण के बाहरी स्तर की कोशिकाओं से अपरा (Placenta) का निर्माण होता है जबिक आंतरिक स्तर की कोशिकाओं से एक्टोडर्म, मीसोडर्म व एण्डोडर्म का निर्माण होता है।
- (c) **बहु शक्त कोशिकाएँ (Multipotent cell)** इन कोशिकाओं की क्षमता अनेकक्षम की तुलना में कम होती है । इनसे केवल कुछ ही प्रकार की कोशिकाओं का निर्माण होता है । जो सामान्यतया एक ही जनन स्तर से संबंधित होती है ।
- (d) विभेदित कोशिकाएं (Differentiated cell) ये कोशिकाएं वयस्क अवस्था में पाई जाती है । इसमें केन्द्रक व कोशिका द्रव्य का अनुपात 0.7 होता है । इन कोशिकाओं में नियमित अंतराल से विभाजन होता है । इनमें स्वयं की कोशिका के अलावा अन्य कोशिकाओं का निर्माण करने की क्षमता नहीं होती है ।
- स्तंभ कोशिकाओं को इनके स्त्रोत या स्थिति के आधार पर निम्न प्रकारों में वर्गीकृत कर सकते है।
- (i) भूणीय स्तंभ कोशिकाएं (Embryonic stem cell) ये कोशिकाएँ भ्रूण में पाई जाती है । ये कोशिकाएँ पूर्णशक्त(Totipotent) होती है । युग्मनज एवं विदलन के प्रारम्भ में निर्मित कुछ कोरकखण्डों में पूर्णशक्तता (Totipotency) तो पाई जाती है लेकिन प्रारम्भिक कोरक खण्डों द्वारा अपने समान कोशिकाओं का निर्माण नहीं होता है । अर्थात् हम कह सकते है कि परिवर्धन के साथ-साथ कोशिका की पूर्णशक्तता में कमी आती जाती है व पूर्णशक्त कोशिका धीरे-धीरे अनेकक्षम व अंत में पूर्ण विभेदित कोशिका में परिवर्तित हो जाती है ।

- (ii) **भूणीय जनन कोशिकाएँ (Embryonic Germ cell)** ये कोशिकाएँ विकसित हो रहे भूण के परिवर्धित वृषण तथा अण्डाशय में क्रमशः स्पर्मेटोगोनिया व ऊगोनिया के रूप में पाई जाती है।
- (iii) फीटल स्तम्भ कोशिकाएं (Foetal stem cells) युग्मनज के परिवर्धन की प्रारंभिक अवस्थाएं भ्रूण कहलाती है जबिक बाद की प्रावस्थाएं फीटस (Foetus) कहलाती है । फीटस में पाई जाने वाली कोशिकाएँ फीटल स्तंभ कोशिकाएँ कहलाती है ।
- (iv) वयस्क स्तम्भ कोशिका (Adult stem cells) वयस्क अवस्था में पाई जाने वाली कुछ कोशिकाएँ बहुक्षम (Multipotent) प्रकार की होती है । जैसे मनुष्यों की अस्थिमज्जा (Bone marrow) में पाई जाने वाली कोशिकाएं इस प्रकार की होती है ।

यही पर अध्ययन की दृष्टि से निम्न प्रकार की स्तम्भ कोशिकाओं का वर्णन किया जा रहा है।

8.2.1 हिमेटोपॉईटिक स्तम्भ कोशिका उत्पादन स्थल (Haematopoietic stem cells) -

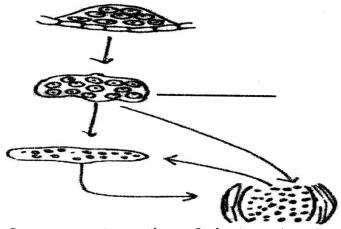
मनुष्यों में हिमेटोपोइसिस का मुख्य स्थल अस्थियों की मेड्यूलरी गुहा में उपस्थित मज्जा होती है । इसमें लगभग 6 Billion cell/ Kg/ day की दर से निर्मित होती है । जन्म के पश्चात हड्डियों में लाल अस्थि मज्जा की मात्रा में कमी आती जाती है । हाथ तथा टांगों की अस्थियों में हिमेटोपोईटिक कोशिकाओं का प्रतिस्थापन वसा कोशिकाओं से हो जाता है । अस्थि मज्जा का 50% अवकाश, वसा कोशिकाओं से भरा रहता है । इन कोशिकाओं में निरंतर कांयातरण चलता रहता है । वृद्धावस्था में लाल अस्थि मज्जा का रूपान्तरण श्वेत अस्थि मज्जा (White bone marrow) से हो जाता है । हिमोलाइटिक एनीमिया के समय पित्त अस्थि मज्जा (Yellow bone marrow) प्न: सक्रिय होकर लाल मज्जा में परिवर्तित हो जाती है ।

रक्त वाहिनियों की भित्ति में एण्डोथीलियल कोशिका, पतली आधार कला एवं फाइब्रोब्लास्ट कोशिकाएँ उपस्थित होती है जो एडिपोसाइट में परिवर्तित हो सकती है। एण्डोथीलियम एवं रेटिकूलर कोशिकाएँ हिमेटोपोइसिस के लिये आवश्यक साइटोकाइन नामक रसायन की उत्पति का मुख्य स्त्रोत होती है। हिमेटोपोईसिस का नियंत्रण अनेक उत्प्रेरक एवं अवमंदक कारकों के कोशिकीय सम्पर्क एवं बाहय कोशिकीय वातावरण द्वारा होता है इस वातावरण में हिमेटोपोईटिक स्तम्भ कोशिका विभेदित होकर सभी प्रकार की रक्त कोशिकाओं में साम्यावस्था को बनाये रखने के लिये निरंतर रक्त कोशिकाओं का निर्माण करती रहती है। अत्यिधक रक्त क्षति, हिमोलाइसिस शोध, साइटोपेनिया एवं अन्य कारणों से रक्त कोशिकाओं के उत्पादन की दर बढ जाती है।

उत्पादन स्थल (Production site) - परिवर्धन की विभिन्न प्रावस्थाओं में रक्त कोशिकाओं का निर्माण अलग-2 अंगों में होता है ।

- (i) मीसोब्लास्टिक हिमेटोपॉइसिस (Mesoblastic Haematopoiesis) गर्भावस्था के प्रथम तीन महीनों में रक्त कोशिकाओं का निर्माण एरिया वेस्कुलोसा या योक सेक में होता है ।
- (ii) हिपेटिक हिमेटोपॉइसिस (Hepatic haematopoisis) गर्भावस्था के चौथे से छठे महीने में रक्त कोशिकाओं का निर्माण यकृत के द्वारा होता है। प्लीहा तथा लिम्फ नोड में भी इसका निर्माण होता है।

- (iii) **माइलोइड हिमेटोपोइसिस (Mycloid Haematopoesis)** गर्भावस्था के सातवें से नौवें महीने में रक्त कोशिकाओं का निर्माण अस्थि मज्जा में होता है।
- (iv) मेडयूलरी हिमेटोपॉइसिस (Medullary Haemato Poesis) जन्म के पश्चात् रक्तकोशिकाओं का निर्माण अस्थि मज्जा में होता है । जीवन के प्रारम्भिक वर्षा में सभी अस्थियां सिक्रिय मज्जा से भरी रहती है । जबिक 20 वर्ष के पश्चात् लंबी अस्थियों का ऊपरी भाग सिक्रिय कोशिकाओं से भरा रहता है । आवश्यकता पड़ने पर यकृत तथा प्लीहा में भी इनका निर्माण होता है । आयु बढ़ने के साथ-साथ अस्थियों की लाल मज्जा (Red marrow) के स्थान पर पित्त मज्जा (Yellow marrow) एवं अंत में श्वेत मज्जा (White marrow) प्रतिस्थापित हो जाती है । वृद्धावस्था में ओस्टिओपोरोसिस (Osteoporosis) के कारण अस्थि मज्जा खोखली हो जाती है ।



चित्र 8.2 मनुष्य के भ्र्ण में रक्त निर्माण के उत्तरोतर स्थल

हिमेटोपोईसिस की प्रक्रिया निम्न पदों में होती है।

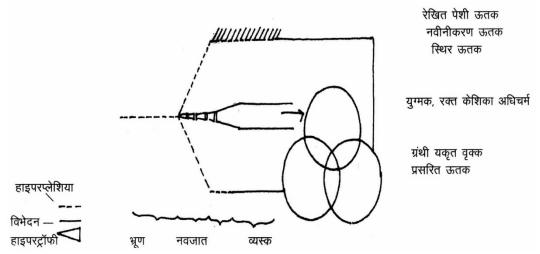
- प्रथम पूर्णशक्त स्तम्भ कोशिका CFU-ML होती है ।
- इस कोशिका में CFU-S(Blood cells) एवं CFU-L(Lymphocyte) का निर्माण होता है।
- CFU-S तथा CFU-L स्वयं में पूर्णशक्त कोशिकाएं होती है क्योंकि ये अन्य कोशिकाओं में विभेदित हो सकती है।
- CFU-S में सर्वप्रथम निर्मित होने वाली कोशिकीय संतित एक प्रकार की समर्पित स्तम्भ कोशिका (Committed stem cells) होती है ।
- BFU-E (Burot Forming Unit-Erythroid) का निर्माण CFU-S के द्वारा होता है । यह अपनी स्वयं की कोशिका के अलावा केवल एक प्रकार की कोशिका का निर्माण कर सकती है ।
- यह नवनिर्मित कोशिका CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) होती है ।
- CFU-E इरिथ्रोपोयटिन हार्मीन के कारण विभेदित होकर प्रोइरिथ्रोब्लास्ट (Proerythroblast) का निर्माण करती है ।
- इरिथ्रोपोयटिन का निर्माण वृक्क में होता है । यह ग्लाइकोप्रोटीन प्रकृति का होता है ।

- ullet यदि रक्त में O_2 का स्तर कम हो जाता है तो इरिथ्रोपोयटिन का उत्पादन बढ. जाता है ।
- परिपक्वन के दौरान प्रोइरिथ्रोब्लास्ट का रूपांतरण इरिथ्रोब्लास्ट में हो जाता है । इस कोशिका में अप्रत्याशित मात्रा में हिमोग्लोबिन का निर्माण होता है ।
- इरिथ्रोब्लास्ट अपने केन्द्रक को बाहर धकेल देती है तथा रेटिकूलोसाइट में परिवर्तित हो जाती है । इस कोशिका में अनुलेखन क्रिया नहीं होती हे । लेकिन पूर्व निर्मित m-RNA मै द्वारा प्रोटीन का संश्लेषण होता रहता है ।
- विभेदन की अंतिम प्रावस्था में इरिथ्रोसाइट(Erythrocyte) का निर्माण होता है । इस कोशिका में विभाजन अनुलेखन एवं प्रोटीन संश्लेषण नहीं होता है
- यह कोशिका अस्थि मज्जा से प्रवास करके रक्त में चली जाती है।
- इसी प्रकार CFU-L कोशिका का परिवर्धन होता है । इससे अन्य प्रकार की स्तंभ कोशिकाओं का निर्माण होता है जो ग्रेन्यूलोसाइट एवं मेक्रोफेज के निर्माण हेत् उत्तरदायी होती है ।

हिमेटोपोइसिस को प्रभावित करने वाले कारक - रक्त कोशिकाओं के निर्माण को प्रभावित करने वाले कारक हिमोपोइटिक वृद्धि कारक कहलाते है । इनमें से कुछ कारक प्रारम्भिक स्तम्भ कोशिका के विभाजन एवं परिपक्वन को प्रेरित करती है । कुछ कारक विशिष्ट कोशिकीय संतित के विभेदन हेतु उत्तरदायी होते है । इन कोशिकाओं की इन कारको के प्रति होने वाली अनुक्रिया, कोशिकीय सतह पर उपस्थित ग्राही प्रोटीन पर निर्भर करती है । इन ग्राही प्रोटीन की संख्या बहुत कम होती है । CFU-E कोशिका में इरिश्रोपोइटिन कारक हेतु 700 ग्राही उपस्थित होते है । कुछ कारकों का निर्माण अस्थि मज्जा में उपस्थित स्ट्रोमलकोशिकाओं द्वारा होता है । प्लीहा में उपस्थित कोशिकाएं इरिश्रोइड परिवर्धन हेतु तथा अस्थि मज्जा में उपस्थित ग्रेन्यूलोसाइट परिवर्धन हेतु प्रभावी होती है ।

गोर्डन तथा हंट (Gorden and Hunt 1987) के अनुसार अस्थि मज्जा एवं प्लीहा में एक प्रकार का क्षेत्रीयकरण पाया जाता है । प्रत्येक क्षेत्र में अलग-अलग प्रकार के वृद्धि कारक उपस्थित होते है । यदि एक स्तम्भ कोशिका को इन अलग-अलग क्षेत्रों मे प्रवेश कराया जाए तो अलग-अलग वृद्धि कारकों के कारण यह स्तम्भ कोशिका अलग-अलग प्रकार की कोशिकाओं मे विभेदित हो जाती है ।

विभाजन क्रियाशीलता - व्यस्क अवस्था में उपस्थित कुछ कोशिकाओं में विभाजन की क्षमता समाप्त हो जाती है । कुछ में प्रसरण की क्षमता होती है । कुछ में नवीनीकरण की क्षमता होती है । जिसके कारण पुरानी कोशिकाएं नष्ट होती है व इनके स्थान पर नवीन कोशिकाएं प्रतिस्थापित होती रहती है । कुछ कोशिकाओं एवं अंगों में स्थैतिकता प्रसरण एवं नवीनीकरण में से कोई भी दो गुण उपस्थित हो सकते है । अर्थात् इनमे द्वैत प्रकृति पाई जाती है ।



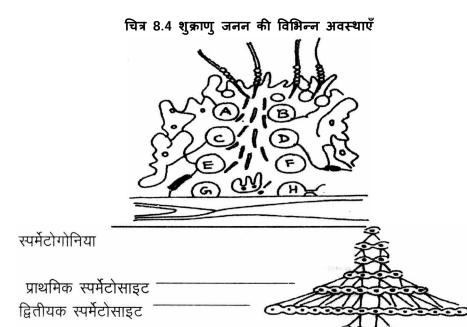
चित्र 8.3 जीव के विकास के दौरान ऊतक वृद्धि व विभेदन के प्रकार

8.2.2 शुक्राणु स्तम्भ कोशिका -मनुष्यों में RBC के समान शुक्राणु कोशिकाओं का निरंतर निर्माण होता रहता है । इन दोनों उदाहरणों में विशिष्ट स्तम्भ कोशिका प्रचुरोद्भवन द्वारा अंत में विभेदित कोशिका में परिवर्तित हो जाती है । शुक्राणु की स्तम्भ कोशिकाएँ वृषण में उपस्थित होती है । शुक्रजनक निलकाओं में विभेदित होते हुए शुक्राणु के चारों ओर सर्टोली कोशिकाएँ उपस्थित होती है । शुक्रजनक निलकाओं के बाहर रिक्त अवकाश में लेंडिंग की कोशिकाएं उपस्थित होती है ।

इन स्तंभ कोशिकाओं की वृद्धि तथा विभेदन लेंडिंग कोशिकाओं द्वारा स्त्रावित स्टीरोयड एवं एण्ड्रोजन हॉर्मोन के कारण होता है । सर्टोली कोशिकाओं द्वारा TBP (Testosterone binding protein) का निर्माण होता है जो इस विभेदन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है ।

जब स्तम्भ कोशिका की एक पुत्री कोशिका शुक्राणु के निर्माण हेतु उत्तरदायी हो जाती है तो इसमें केवल पांच या छः बार पुत्री विभाजन होता है अंत में स्पर्मेंटोगोनिया का एक समूह बन जाता है । यद्यपि इस विभाजन में केन्द्रक का विभाजन तो पूर्ण हो जाता है लेकिन कोशिका द्रव्य का विभाजन अपूर्ण होता है अतःगुणन प्रावस्था में निर्मित समस्त स्पर्मेंटोगोनिया आपस में कोशिकाद्रव्यी सेतु द्वारा जुड़े रहते है । इस बहु केन्द्रीय समूह में होने वाले समस्त विभाजन तुल्यकाल होते है । कोशिका द्रव्यी सेतु द्वारा विभिन्न नियामक अणुओं का परिवहन एक कोशिका रो दूसरी कोशिका में होता रहती है । ज्यों-ज्यों विभाजन होता रहता है कोशिकाद्रव्य की मात्रा कम होती रहती है । इसी कारण अंत में अत्यधिक छोटे आकार के शुक्राणु का निर्माण होता है ।

इन सूत्री विभाजनों के पश्चात् दो अर्द्ध सूत्री विभाजन - । तथा । । संपन्न होते है । इस कारण अगुणित स्पर्मेटोसाइट का निर्माण होता है । अंत में जब शुक्राणु का निर्माण हो जाता है तो ये शुक्रजनक निर्माओं में स्वतंत्र हो जाते हैं ।



स्पर्मेटिड

शुकाणु ⁻ अंतशेषी

श्काण्

8.2.3 **हाइड्रा की अंतराली कोशिका** - हाइड्रा में अंतराली कोशिका स्तम्भ कोशिका का कार्य करती है । इसः अंतराली कोशिका द्वारा लगभग सभी कोशिकाओं का निर्माण हो जाता है । कोशिकाओं के प्रतिस्थापन की दर कोशिकाओं की मृत्यु दर के समान होती है।

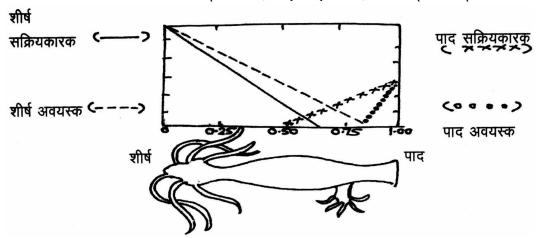
प्रचुर मात्रा में भोजन किये हु ये हाइड्रा में स्तम्भ कोशिका द्वारा उच्चतम दर से विभिन्न कोशिकाओं का निर्माण होता है । भूखे हाइड्रा में नवीन कोशिकाओं का निर्माण नहीं होता है लेकिन स्तम्भ कोशिका विभाजित होती रहती है एवं प्रचुर मात्रा में भोजन उपलब्ध होने पर इनकी वृद्धि दर में बढ़ोतरी हो जाती है । वातावरण में CO_2 की मात्रा में वृद्धि होने पर हाइड्रा में लैंगिक जनन प्रेरित हो जाता है ।

हाइड्रा की एक्टोडर्म तथा एण्डोडर्म में नवीन कोशिकाओं की उत्पति देह स्तम्भ में होती है । यहाँ से कोशिकाएं प्रवास करके स्पर्शक एवं पेडल डिस्क की तरफ चली जाती है । इन दोनों छोर से पुरानी कोशिकाएं निरंतर झडती रहती है । निमेटोसिस्ट के निर्माण के दौरान अंतराली कोशिका विभाजित होकर निमेटोसाइट पूर्ववर्ती कोशिका का निर्माण करती है एवं निमेटोसाइट का एक समूह निर्मित हो जाता है । पूर्ण विभेदित निमेटोसाइट अंत में प्रवास करके स्पर्शकों में चली जाती है । प्रत्येक भोजन ग्रहण के पश्चात् इसका नवीन कोशिकाओं में रूपान्तरण हो जाता है । इसी प्रकार तंत्रिका कोशिकाओं का निर्माण अंतराली कोशिकाओं से होता है । निमेटोसाइट का विभेदन देह स्तम्भ में होता है जबिक तंत्रिका कोशिकाओं का विभेदन शीर्ष भाग में होता है ।

जिन अंतराली कोशिकाओं से दोनों प्रकार की कोशिकाओं का निर्माण होता है । वह सामान्यतया देह स्तम्भ में पाई जाती है । लेकिन तंत्रिका कोशिका का निर्माण करने वाली कोशिका में विभेदन से पहले प्रवासन होता है जबकि निमेटोसिस्ट में विभेदन के पश्चात् प्रवासन होता है ।

यदि किसी हाइड्रा में अंतराली कोशिका को निकाल दिया जाये तो हाइड्रा में तो वृद्धि होती रहती है लेकिन इसमें स्वयं भोजन ग्रहण करने की क्षमता समाप्त हो जाती है ।

एक सामान्य हाइड्रा की देह स्तम्भ में 90,000 कोशिकाएं उपस्थित होती है। इनकी 4 प्रतिशत अंतराली कोशिकाएं होती है। 600 स्तम्भ कोशिकाओं से 500 तंत्रिका कोशिकाओं एवं 1800 निमेटोसाइट का प्रतिदिन निर्माण होता है। इनसे 3400 नई अंतराली कोशिकाओं का निर्माण प्रतिदिन होता है। अतः पुत्री कोशिकाओं का 60 प्रतिशत स्तम्भ कोशिका के रूप में एवं 40 प्रतिशत विभेदित कोशिकाओं के रूप में निरूपण होता है। प्रचुरोद्भवन एवं विभेदन का निर्णय क्लोन परिवर्धन की प्रारंभिक अवरथा में हो जाता है। संभवतया इसका नियंत्रण ऋणात्मक पुनर्भरण द्वारा होता है। यदि अंतराली कोशिका की संख्या कम हो जाये तो तुरंत ही स्तम्भ कोशिका की संख्या कम होने पर नवीनीकरण की दर में वृद्धि हो जाती है। स्तम्भ कोशिका की संख्या अधिक होने पर नवीनीकरण की दर में कमी आ जाती है।हाइड्रा में शीर्ष तथा आधार डिस्क में विशेषताएं पाई जाती है। इस गुण को धुवता एवं कोशिकीय विभेदन हेतु काम में लिया जा सकता है। इन दोनों छोर पर प्रेरण एवं अवमंदन की प्रवणता पाई जाती है। यदि हाइड्रा के शीर्ष भाग को काट दिया जाए तो इसमें शीर्ष भाग का पुनः निर्माण हो जाता है। इस प्रक्रिया को पुनरूद्भवन कहते हैं जिसका अध्ययन हम अगली इकाई में करेंगे यह तरना जाता है कि शीर्ष भाग के निर्माण के लिये एक विशिष्ट पेप्टाइड उत्तरदायी होता है। यदि जल में इस पेप्टाइड की



चित्र 8.5. हाइड्रा में पोजीशनल इनफोरमेशन (Positional Information) के मॉडल द्वारा दर्शाया गया है कि शीर्ष प्रेरक अधिक और शीर्ष संदमक कम होने से शीर्ष का निर्माण तथा पाद प्रेरक अधिक और पाद संदमक कम होने से पाद का निर्माण होता है।

सांद्रता में वृद्धि. कर दे तो हाइड्रा में स्पर्शकों की संख्या में वृद्धि हो जाती है। इस पेप्टाइड की सर्वाधिक मात्रा तंत्रिका कोशिकाओं में पाई जाती है। तंत्रिकाओं की संख्या शीर्ष भाग पर अधिक होती है। लेकिन जिस हाइड्रा में अंतराली कोशिकाएँ नहीं होती हैं उनमें तंत्रिका कोशिका भी अनुपस्थित होती है। लेकिन इस हाइड्रा में पुनरूद्भवन द्वारा शीर्ष भाग का निर्माण होता है।

अतः शीर्ष भाग के निर्माण की प्रक्रिया अत्यधिक जटिल है। चित्र संख्या 8.5 में प्रदर्शित मॉडल से स्पष्ट है कि किस प्रकार शीर्ष प्रेरक व अवमंदक तथा पाद प्रेरक व अवमंदक में वितरण प्रवणता पाई जाती है। जिससे की शीर्ष व पाद का निर्माण होता है।

8.3 स्तंभ कोशिकाओं का महत्व:

परिवर्धन विज्ञान के क्षेत्र में कार्यरत् वैज्ञानिक अभी भी अनेक अनसुलझे रहस्यों की गुत्थियाँ सुलझाने में लगे हुए है । जैसे -

- किस प्रक्रिया के दवारा अविभेदित कोशिकाओं में विशिष्टीकरण होता है।
- वे भौनसी जैव रासायनिक प्रक्रियाएँ है जो एक स्तम्भ कोशिका में पाई जाती है।
- किन परिवर्तनों के कारण स्तम्भ कोशिका अपनी विभाजन क्षमता खोकर विशिष्टीकृत हो
 जाती है ।
- किन प्रक्रमों के द्वारा कायिक कोशिकाओं में रिप्रोग्रामिंग होती है।
- किस प्रकार एक विशिष्टीकृत कोशिका पुन: अविभेदित हो जाती है ।

वैज्ञानिकों ने ऊपर वर्णित अनेक प्रक्रियाओं का पता लगा लिया है तथा निम्न क्षेत्रों में इनका महत्व है।

- (1) औषधी परीक्षण वर्तमान में संश्लेषित औषधियों को मानव द्वारा उपयोग में लाने से पहले इनको चूहों तथा बंदरों पर प्रेक्षित किया जाता है । लेकिन यदि स्तम्भ कोशिकाओं को पात्र में (In vitro) सवधित किया जाए तथा इनसे निर्मित ऊतकों या अंगों पर औषधियों के प्रभावों का प्रेक्षण किया जाए तो परीक्षण कार्य बहुत आसान हो जायेगा ।
- (2) **रोगों का इलाज** स्तंभ कोशिकाओं पर हो रहे शोध कार्यों के आधार पर अनेक रोगों के इलाज की संभावनाएँ काफी बढ़ गई है ।
- (a) मधुमेह- IDDM (Insulin Dependent diabetes mellitus) जो एक प्रकार का आनुवांशिक मधुमेह है । इस रोग में अग्नाशय की β कोशिकाओं का निर्माण नहीं होता है । अतः रोगी को नियमित रूप से इंसुलिन का इंजेक्शन लगाना पड़ता है । यदि कोशिकाओं में इनका प्रत्यारोपिण कर दिया जाये तो इस रोग से छ्टकारा पाया जा सकता है ।
- (b) **हदयाघात** हदयाघात में रक्त की आपूर्ति के कम हो जाने या रूक जाने के कारण कार्डियक पेशियाँ कमजोर हो जाती है । इस कारण हदय की पम्पिंग प्रणाली अवरूद्ध हो जाती है । लेकिन स्तम्भ कोशिकाओं के संवर्धन से हृदय पेशियों का निर्माण किया जा सकता है । इन पेशियों को हृदय में प्रत्यारोपित किया जा सकता है ।
- (c) **पार्किन्सन रोग** इस रोग में मस्तिष्क की तंत्रिका स्त्रावी कोशिकाओं से डोपेमिन का स्त्राव नहीं होता है । डोपेमिन महत्वपूर्ण बायोजेनिक एमिन होते है । स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा डोपेमिन का स्त्राव करने वाली कोशिकाओं का निर्माण किया जा सकता है ।
- (d) **इस्केमिक आघात** कई बार थ्रोम्बस एवं एम्बोलस के कारण रक्त वाहिनियाँ रूक जाती है । इस कारण मस्तिष्क में रक्त व ऑक्सीजन की आपूर्ति कम होने से तंत्रिकाएं मर जाती है । स्तम्भ कोशिकाओं दवारा इन क्षतिग्रस्त तंत्रिका कोशिकाओं का निर्माण किया जा सकता है ।

(e) अंग प्रत्यारोपण - केवल एक समान जुड़वां बच्चों में अंग प्रत्यारोपण संभव है । अन्य पिरिस्थितियों में प्रत्यारोपित अंग व परपोषी के एंटीजन एक समान नहीं होने पर अंगों का प्रतिकार हो जाता है । स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा इन अंगों का निर्माण कर प्रत्यारोपण को सफल बनाया जा सकता है ।

इसी प्रकार एल्जीमर रोग, होजिकन लिम्फ़ोमा, गाँचर रोग का उपचार स्तम्भ कोशिकाओं से किया जा सकता है ।

8.4 स्तम्भ कोशिकाओं के अनुप्रयोगः

- (i) कुछ रासायनिक एवं भौतिक तत्वों का सीधे ही मानव शरीर पर पड़ने वाले प्रभावों का अध्ययन एक कठिन कार्य हैं ।इसलिए मानव शरीर से मिलते हुए अन्य स्तमधारियों पर करना पड़ता है किन्तु स्तम्भ कोशिकाओं की सहायता से यदि संवर्धन माध्यम में ऊतक एवं अंगों का निर्माण करके सीधे ही रासायनिक एवं भौतिक तत्वों के प्रभाव का अध्ययन कर सकेंगे ।
- (ii) अस्थि मज्जा स्थानान्तरण इस तकनीक की सहायता से स्वस्थ व्यक्ति की अस्थि की खोखली गुहा में से इंजेक्शनों की सहायता से स्तम्भ कोशिका युक्त अस्थि मज्जा निकाल कर समान जेनेटिक संगठन वाले व्यक्ति जिसमें कि रक्त का उत्पादन सुचारु रुप से ना हो रहा हो (थैलेसिमया रोग) की मज्जा में स्थानान्तरित करके उसके शरीर में भी रक्त का उत्पादन सुधारा रुप से किया जा सकता है।
- (iii) किसी अन्य व्यक्ति के शरीर के अंग को यदि दूसरे व्यक्ति में स्थानान्तरित किया जाता है तो शरीर द्वारा अंगों को अस्वीकृत करने की प्रबल संभावनाएं होती है । किन्तु यदि उसी व्यक्ति के शरीर की स्तम्भ कोशिकाओं को नियत वातावरण मैं संवर्धन माध्यम में रखकर इच्छित अंगों का निर्माण कर दिया जाए तो क्षतिग्रस्त अंगों की मरम्मत में स्तम्भ कोशिकाएँ महत्वपूर्ण भूमिका निभा सकती हैं ।

8.5 सारांश:

प्राणियों के अधिकांश ऊतक विभेदित कोशिकाओं के बने होते हैं जो लम्बे समय तक विभाजित नहीं होते हैं । प्राणियों में अनेक प्रकार की स्तम्भ कोशिकाएं पाई जाती है । एक विकसित प्राणी में वयस्क अवस्था में विभेदित कोशिका, निर्धारित कोशिका, सामर्थ्यपूर्वी कोशिका एवं सामर्थ्यपूर्वी कोशिका पाई जाती है ।विभाजन क्षमता के आधार पर यह कोशिकाएं पूर्णशक्त अनेकक्षम, बहु शक्त एवं विभेदित प्रकार के हो सकते हैं । स्तनधारियों में स्तम्भ कोशिकाएं भ्रूण, फीटस तथा व्यस्क में पाई जाती है । मनुष्यों में त्वचा, वृषण, अण्डाशय एवं अस्थियों की अस्थिमज्जा में स्तम्भ कोशिकाएं पाई जाती है ।

8.6 शब्दावली

विभेदन - अविभेदित कोशिका का विभेदित कोशिका में रूपान्तरण पूर्ण शक्तता जब एक कोशिका सम्पूर्ण प्राणी का निर्माण करने में सक्षम हो सकती है । स्तम्भ कोशिका - प्राणियों में पाई जाने वाली वे कोशिकाएं जो भ्रूणीय प्रकृति की होती है जिनसे आवश्यकता पड़ने पर अन्य कोशिकाओं या अंगों का निर्माण किया जा सकता है । रक्त जनन - अस्थिमज्जा में रक्त निर्माण की परिघटना । इरिथ्रोपोइटिन (Erythropoietin) - वृक्क द्वारा स्त्रावित एक प्रकार का हार्मोन अन्तराली कोशिका - प्राणियों में पाई जाने वाली वे कोशिकाएं जो भ्रूणीय प्रकृति की होती है ।

8.7 संदर्भ ग्रंथ:

- डि रोबरटिस : सैल बायोलॉजी
- जीन VIII : लेविन
- डवलपमेन्टल बायलॉजी : स्कॉट.एफ.गिल्बर्ट
- डवलपमेन्टल बायलॉजी : वॉलपर्ट
- डवलपमेन्टल बायलॉजी : सॉन्डर्स

8.8 बोध प्रश्न:

- 1. एक सामान्य व्यक्ति में प्रतिदिन..... RBC नष्ट होती हैं
- 2. एक सामान्य व्यक्ति की RBC की आय्..... होती है ।
- 3. युग्मनज एक...... प्रकार की कोशिका होती है।
- 4. पूर्णशक्त कोशिकाओं को समझाइये।
- 5. ब्लास्टोमियर कोशिकाएँ होती है।
- 6. स्तम्भ कोशिकाओं का उपयोग..... में किया जाता है।

8.9 अभ्यासार्थ प्रश्न :

- 1. स्तम्भ कोशिकाओं से आप क्या समझते है?
- 2. एक वयस्क प्राणी में कितने प्रकार की कोशिकाएं उपस्थित हो सकती है?
- 3. निम्न से आप क्या समझते है?
- (a) स्तम्भ कोशिका (Stem cell)
- (b) हिमेटोपोइसिस (Haematoposis)
- (c) अंतराली कोशिका (Interstitial)
- (d) स्पर्मेटोगोनिया (Sprematogina)
- (e) निर्धारी कोशिका (Determined cells)
- (f) सामर्थ्य पूर्वी कोशिका (Pre competent cell)
- (g) सामर्थ्य युक्त कोशिका (Competent cell)
- 4. स्तम्भ कोशिकाएँ मातृक कोशिकाएँ होती है । इस कथन की व्याख्या कीजिये ।
- 5. हिमेटोपोइसिस की विधि का वर्णन कीजिये।
- 6. प्राणियों में पाई जाने वाली विभिन्न स्तम्भ कोशिकाओं के नाम बताइये ।
- 7. स्तम्भ कोशिकाओं के महत्व पर एक लघु टिप्पणी लिखो?

इकाई - 9

मरम्मतकारी औषधी । प्राणीयों में पुनरुद्भवन । पुनरुद्भवन के प्रकार ,प्नरुद्भवन व प्रत्यारोपण द्वारा क्षतिग्रस्त ऊतक एवं अंगों की मरम्मत ।; रेटिनोयड्स द्वारा प्नरुद्भवन में प्रेरण । MEDICINE. REGENERATION REPARATIVE ANIMALS. TYPE OF REGENERATION. TISSUES OF DAMAGED AND ORGANS REGENETATION AND TRANSPI ANTATION RETINOIDS IN INDUCTION OF REGENERATION.

इकाई की रूपरेखा

- 9.0 उद्देश्य
- 9.1 प्रस्तावना
- 9.2 मरम्मतकारी औषधी
- 9.3 प्नरूद्भवन
- 9.4 प्नरुद्भवन के प्रकार
 - 9.4.1 कार्यिकी पुनरूद्भवन
 - 9.4.2 अभिरूपान्तरण पुनरूद्भवन
 - 9.4.3 अंगान्तरण प्नरूद्भवन
 - 9.4.4 विषमान्तरण पुनरूद्भवन
 - 9.4.5 परापुनरूद्भवन
- 9.5 प्राणीजगत में पुनरूद्भवन क्षमता
 - 9.5.1 प्रोटोजोआ में पुनरूदभवन
 - 9.5.2 स्पंजों / पोरीफेरा में पुनरूदभवन
 - 9.5.3 सीलेन्ट्रेटा में पुनरूद्भवन
 - 9.5.4 प्लेटीहेल्मिन्थिज में पुनरूद्भवन
 - 9.5.5 निमेटोड में पुनरूद्भवन
 - 9.5.6 एनेलिड में पुनरुद्भवन
 - 9.5.7 आर्थीपोडा में पुनरूद्भवन
 - 9.5.8 मोलस्का में पुनरुद्भवन
 - 9.5.9 इकाइनोडर्मेट्स में पुनरुद्भवन
 - 9.5.10 मछलियों में पुनरूद्भवन

- 9.5.11 उभयचरों में प्नरूद्भवन
- 9.5.12 सरीसृपों में पुनरूद्भवन
- 9.5.13 पक्षियों में पुनरूद्भवन
- 9.5.14 स्तनधारियों में पुनरूद्भवन
- 9.6 प्नरूद्भवन के दौरान आकारिकी घटनाएँ
 - 9.6.1 प्रमुकूल पूर्वास्था अथवा घाव के भरने की प्रावस्था
 - 9.6.2 प्रमुकूल निर्माण प्रावस्था
 - 9.6.3 अद्यो-विभेदन प्रावस्था
 - 9.6.3.1 वास्तविक अद्यो-विभेदन प्रावस्था
 - 9.6.3.2 आश्रित अदयो-विभेदन प्रावस्था
 - 9.6.3.3 आभासी अद्यो-विभेदन प्रावस्था
 - 9.6.4 पुनर्विभेदन
 - 9.6.4.1 मेटाप्लेसिया
 - 9.6.4.2 मांडुलन
- 9.7 प्नरूद्भवन के दौरान कार्यिकी प्रगति -
 - 9.7.1 अपचय प्रावस्था
 - 9.7.2 निर्माण व उपचय प्रावस्था
- 9.8 रेटिनोयड्स द्वारा पुनरुद्भवन में प्रेरण
- 9.9 सारांश
- 9.10 शब्दावली
- 9.11 संदर्भ ग्रन्थ
- 9.12 बोध प्रश्न
- 9.13 अभ्यासार्थ प्रश्न

9.0 उद्देश्य :

इस इकाई में हम खोये हुए अंगों को पुनः प्राप्त करने की जैविक क्षमता के बारे में जानकारी प्राप्त करेंगे पुनरूदभवन एक जटिल प्रक्रिया है जिसकी सहायता से प्राणी अपने खोये या नष्ट अंगो को पुनः प्राप्त कर लेते है। प्राणी जगत में विभिन्न संघो में पुनरूदभवन क्षमता पाई जाती है तथा यह अकशेरूकी से कशेरूकी तक किस प्रकार घटती जाती है। साथ ही यह जानेंगे कि पुनरूद्भवन प्रक्रिया के दौरान क्या-क्या आकारिकीय तथा कार्यिकी परिवर्तन होते है।

9.1 प्रस्तावना :

पुनरूद्भवन वह क्रिया है जिसमें क्षतिग्रस्त अंग का शरीर की कोशिकाओं द्वारा पुन: निर्माण हो जाता है ।यह एक अत्याधिक महत्वपूर्ण प्रक्रिया है तथा कई जटिल जैविक क्रियाओं के द्वारा सम्पन्न होती है । प्राणी जगत में विभिन्न संघों व वर्गों में पुनरुद्भवन की अलग-अलग क्षमता पाई जाती है । जैसे-'जैसे शारीरिक जटिलता बढती जाती है पुनरूद्भवन की क्षमता घटती जाती है ।यह प्रक्रिया उद्विकास के दौरान उच्च कम के प्राणियों में धीरे-धीरे कम होती गई इसी का परिणाम है कि स्तनधारियों में पुनरूद्भवन की क्षमता बहुत कम पाई जाती है ।एक ही प्राणी में शरीर के विभिन्न अंगो में पुनरूद्भवन की अलग-अलग क्षमता पाई जाती है जैसे कि छिपकली की कटी पूँछ का पुनरूद्भवन हो जाता है लेकिन कटे हुए हाथ पैरों का पुनरूद्भवन नहीं होता है । आधुनिक जैव चिकित्सा विज्ञान में पुनरूद्भवन का अध्ययन मरम्मतकारी औषधी(Reparative - medicine) चिकित्सा क्षेत्र में निरंतर बढता जा रहा है तथा हमारे देश में भी इस वैज्ञानिक क्षेत्र में विश्वस्त की उपलब्धियां हासिल की है ।

9.2 मरम्मतकारी औषधी (Reparative medicine)

जैसा कि हम जानते हैं कि वयस्क जीव के खोये या नष्ट हुए अंगों या शरीर के भाग को पुन: प्राप्त करने की क्षमता को पुनरुद्भवन कहते हैं । पुनरुद्भवन की यह क्षमता एक तरह से भ्रूणीय विकास के पदों का पुन: निर्धारण या दोहराया है । जिसके अन्तर्गत पूर्णत: विभेदित कोशिकाओं का अपनी विभेदन क्षमता को खोकर अविभेदित बहु शक्त कोशिकाओं में परिवर्तित होना, फिर विभाजन करके अपनी संख्या में वृद्धि कर पुन:विभेदित हो कर क्षतिग्रस्त अंग को पुन: प्राप्त करना सम्मिलित है ।प्रश्न पैदा होता है कि क्या अद्यो-विभेदन के बिना क्षतिग्रस्त अंग की मरम्मत नहीं की जा सकती है? स्तम्भ कोशिकाओं की खोज तथा विभेदित कोशिकाओं को जीन रुपान्तरण दवारा अदयो-विभेदित कर क्षतिग्रस्त अंग की मरम्मत की जा सकती हैं ।

किसी नष्ट भाग / अंग पर हम स्तंभ कोशिकाओं का आरोपण कर दे तो वे स्तम्भ कोशिकाएँ उस नष्ट भाग या अंग का पुनःउत्पादन करने में भी सक्षम है इस प्रकार की जीवित कोशिकाओं की सहायता से किसी ऊतक या अंग की मरम्मत करना कोशिका तकनीक कहलाती है तथा इन्हें मरम्मतकारी कोशिका औषधी भी कह सकते है ।उदाहरणार्थ क्षतिग्रस्त अस्थि मज्जा या अस्थि या बड़ी मांस पेशी या मस्तिष्क के किसी भाग में दुर्घटना के कारण हुई क्षति को स्तम्भ कोशिकाओं या उनके समकक्ष पूर्णशक्त अविभेदित कोशिकाओं का निर्माण कर प्रत्यारोपण तकनीक द्वारा उस अंग की मरम्मत की जा सकती है । स्तम्भ कोशिका द्वारा क्षतिग्रस्त अंगों की मरम्मत चिकित्सा विज्ञान का एक महत्वपूर्ण क्षेत्र है । विज्ञान के इस क्षेत्र में जो विज्ञान की उपशाखाएँ सम्मिलित है वे हैं परिवर्धन जैविकी कोशिका जैविकी, प्रतिरक्षा विज्ञान तथा शल्य चिकित्सा विज्ञान ।स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा ऊतकों की मरम्मत जिसे कि ऊतक अभियान्त्रिकी में अध्ययन करते हैं विषय भी चिकित्सा विज्ञान का एक महत्वपूर्ण अंग बनता जा रहा है ।

हाल ही अमेरिका के मियामी स्कूल ऑफ मेडिसिन के चिकित्सकों ने मीसेनकाइमल स्तम्भ कोशिकाओं द्वारा हृदय रोगी की क्षतिग्रस्त मायोकार्डियम की मरम्मत करने में सफलता हासिल की है । मीसेनकाइमल स्तम्भ कोशिकाएँ, मायोकार्डियम चिकनी अरेखित पेशी एण्डोथीलियल कोशिकाओं में विभेदन की क्षमता रखती है साथ ही यह रोगी के प्रतिरक्षा तंत्र द्वारा भी सामान्यतः पहचानने में नहीं आती हैं अर्थात् रोगी का प्रतिरक्षा तंत्र इन्हें स्वीकार कर लेता है । उपरोक्त से यह प्रतीत होता है कि कोशिकाएँ मरम्मतकारी औषधी व ऊतक अभियान्त्रिकी का एक महत्वपूर्ण भाग हैं । कोशिकाओं द्वारा मरम्मतकारी चिकित्सा हेत् जो प्रमुख चुनौतियां हैं वे हैं

1. उपयुक्त स्त्रोत की पहचान जहाँ से कोशिकाएं प्राप्त की जा सके ।

- 2. उपयुक्त तकनीक का विकास
- 3. गुणवत्ता व सुरक्षा की समुचित व्यवस्था

हम सभी यह जानते हैं कि स्तम्भ कोशिकाएं मरम्मतकारी चिकित्सा पद्धित हेतु सर्वाधिक उपयुक्त होती है परन्तु स्त्रोत की उपलब्धता एक महत्वपूर्ण चुनौती है आज के विकसित जीव व चिकित्सा विज्ञान में भी समुचित मात्रा में स्तम्भ कोशिकाएं प्राप्त कर पुनः सफलता पूर्वक प्रत्यारोपण करना व क्षतिग्रस्त अंग की मरम्मत करना आसान नहीं तो असम्भव भी नहीं हैं। स्तम्भ कोशिकाओं के अलावा वैज्ञानिकों को उन अन्य स्त्रोतों की भी तलाश करनी चाहिए जिनसे कि विभेदित कोशिकाओं को अविभेदित बहु शक्त कोशिकाओं में परिवर्तित किया जा सके। राजस्थान विश्वविद्यालय के

वैज्ञानिक डा. नियाजी व उनके सहयोगियों ने अस्सी के दशक के प्रारम्भ में इस दिशा में एक प्रमुख उपलब्धि हासिल की यह खोज थी रेटिनॉइड अणु द्वारा अंग पुनरुद्भवन के समय अविभेदित कोशिकाओं की परिवर्धन क्षमता में अत्यन्त वृद्धि । पुनरुद्भवन कलिका जो कि मेंढक के टेडपॉल के कटे पैर के एक निश्चित भाग की मरम्मत कर पाती थी उसे इन वैज्ञानिकों ने पूर्ण टांग में परिवर्तित कर दिया जिसकी पुष्टि अस्सी व नब्बे के दशकों में इग्लैण्ड, फ्रांस, जर्मनी कनाड़ा व अमेरिकी वैज्ञानिकों ने की ।

क्षतिग्रस्त मस्तिष्क के हिप्पोकेम्पल केन्द्र को अपरा से प्राप्त स्तम्भ कोशिकाओं की सहायता से कई प्राणियों में मरम्मत कराने का प्रयास चेन्नई के स्नातकोत्तर इस्ट्टियूट ऑफ बेसिक मेडिकल साइन्स के प्रो. मुत्थुस्वामी ने सफलता पूर्वक हासिल किया ।

स्तम्भ कोशिकाओं की इस विशिष्टता के कारण मरम्मतकारी औषधी स्तम्भ कोशिकाओं का उपयोग किया जा सकता है अर्थात् स्तम्भ कोशिकाएं क्रियात्मक इकाई है जो कि मरम्मतकारी औषधियों एवं ऊतक अभियांत्रिकी के रुप में प्रयुक्त होती है।

9.3 पुनरुद्भवन:

पुनरूद्भवन वह क्रिया है जिसमें क्षतिग्रस्त अंग का शरीर की कोशिकाओं द्वारा पुन: निर्माण हो जाता है ।यह एक अत्याधिक महत्वपूर्ण प्रक्रिया है तथा कई जटिल जैविक क्रियाओं के द्वारा सम्पन्न होती है ।

9.4 पुनरूद्भवन के प्रकार :

प्राणियों में पुनरूद्भवन की विभिन्न क्षमताएँ पाई जाती हैं । इस आधार पर पुनरूदभवन के निम्न मुख्य प्रकार है

- 9.4.1 कार्यिकी पुनरुद्भवन प्रतिदिन कोशिकाओं में होने वाली हानि का प्रतिस्थापन, उदाहरणः-लाल रक्त कणिकाएं, त्वचा में क्षतिग्रस्त अधिचर्म की कोशिकाओं का पुनःनिर्माण ।
- 9.4.2 **अभिरूपान्तरण** क्षतिग्रस्त अंग का प्रतिस्थापन तथा क्षतिग्रस्त अंग का पुनःनिर्माण हो जाता है ।

उदाहरण - सैलामेण्डर में कटी हुई भुजायें पुनर्निर्मित हो जाती है, छिपकलियों में टूटी हुई पूंछ पुनर्निर्मित हो जाती है।

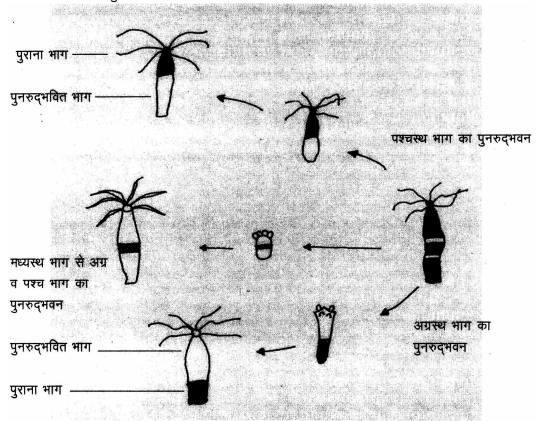
- 9.4.3 अंगान्तरण इस प्रकार का पुनरूदभवन निम्न संघ के प्राणियों स्पंज तथा हाइड्रा में पाया जाता है । इनमें क्षतिग्रस्त भाग पुनर्निर्मित ही नहीं होते है बल्कि प्राणी के एक छोटे से भाग से सम्पूर्ण प्राणी का निर्माण हो जाता है । अंगान्तरण पुनरूद्भवन निम्नतर वर्ग के प्राणियों में पाया जाता है ।
- 9.4.4 विषमान्तरण पुनरूद्भवन जब पुनरूद्भवन के दौरान क्षितिग्रस्त अंग के स्थान पर कोई भिन्न प्रकार की रचना निर्मित हो जाये तो इस घटना को विषमान्तरण पुनरूदभवन कहते है । उदाहरण- पेलीन्यूर्स में आंखो को यदि क्षितिग्रस्त कर दे तो इससे प्रमुकुलन का निर्माण तो होता है लेकिन आंखों के निर्मित होने के बजाय एन्टिना के समान रचना का निर्माण होता है । यदि क्षिति के समय आँख का थोड़ा सा भी क्षेत्र रह जाये तो आँख निर्मित हो जाती है ।
- 9.4.5 परापुनरूद्भवन इस प्रकार के पुनरूदभवन में क्षतिग्रस्त अंग के स्थान पर वही रचना अतिरिक्त रूप में निर्मित हो जाती है । यदि सैलामेण्डर के पैर के कटने के पश्चात् बनने वाली पुनरुद्भवन किलका को यदि 180 डिग्री कोण पर घुमाया जाए तो कटे स्थान पर एक अतिरिक्त पैर का निर्माण हो जाता है । हाइड्रा, प्लेनेरिया में भी परापुनरूद्भवन की क्रिया पाई जाती है ।

9.5 प्राणी जगत में पुनरुद्भवन क्षमता :

पुनरूद्भवन की क्षमता अलग-अलग प्राणियों में अलग-अलग प्रकार की होती है । कुछ में क्षितिग्रस्त अंग के स्थान पर दूसरे अंग का निर्माण हो जाता है । कुछ में परापुनरूद्भवन के द्वारा अतिरिक्त रचना का निर्माण होता है । निर्मोचन के द्वारा पुरानी त्वचा उतरती है । शरीर पर उपस्थित रोम निरंतर वृद्धि करते रहते है । इस प्रकार पुनरूद्भवन की क्षमता उद्विकास के दौरान समाप्त नहीं हुई है बल्कि इसके संगठन के स्तर में परिवर्तन आया है जहां पर इसका प्रदर्शन होता है । निम्न संघों के प्राणियों में उच्च संघों की तुलना में अधिक क्षमता पाई जाती है । एक निकट संबंधी की प्रजातियों में पुनरूद्भवन की क्षमता भिन्न प्रकार की हो सकती है ।

- 9.5.1 प्रोटोजोआ में पुनरूद्भवन:- प्रोटोजोआ के प्राणियों में पुनरूद्भवन की अत्यधिक क्षमता पाई जाती है। यदि प्रोटोजोआ के प्राणियों को अनेक टुकड़ों में विखण्डित कर दिया जाए तो प्रत्येक खण्ड जिसमें केन्द्रक का थोड़ा सा भी अंश हो तो वह सम्पूर्ण प्राणी में परिवर्तित हो जाता है। प्रयोगों में यह पाया गया कि जिन प्राणियों में गुरुकेन्द्रक या कई गुरूकेन्द्रक पाये जाते है उनमें पुनरूद्भवन की क्षमता अधिक पाई जाती है।
- 9.5.2 स्पन्जों में पुनरूद्भवन:- स्पन्जों में पुर्नरचना तथा पुनरूद्भवन दोनों की क्षमता पाई जाती है । यदि स्पन्ज की 200 या इससे अधिक पृथक-पृथक कोशिकाओं को Ca^{+2} , Mg^{+2} की उपस्थिति में किसी पात्र में रखा जाए तो ये कोशिकाएं आपस में संयोजित हो जाती है तथा नये स्पन्ज का निर्माण कर लेती है यह परिघटना पुर्नरचना कहलाती है । यदि स्पन्ज के विखण्डित टुकड़ों में पिनेकोडर्म तथा कोएनोडर्म दोनों स्तर उपस्थित हो तो इनमें पुनरूद्भवन हो सकता है ।
- 9.5.3 सिलेन्ट्रेट में पुनरूदभवन :- सीलेन्ट्रेटा के प्राणियों में भी मोर्फोलेक्टिक प्रकार का पुनरूद्भवन पाया जाता है। हाइड्रा में ट्रेम्बले ने पुनरूद्भवन से सम्बन्धित प्रयोग किये तथा पाया कि हाइड्रा के शरीर का दो सौ वे भाग तक अंश जिसमें (एपिडर्मिस) अधिचर्म तथा गेस्ट्रोडर्मिस उपस्थित हो, सम्पूर्ण हाइड्रा में परिवर्तित हो जाती है हाइड्रा के प्रत्येक खण्ड में ध्रुवता भी पाई जाती है जो भाग

मुख के अधिक निकट होता है वह अग्र भाग होता है तथा इससे हमेशा आगे का भाग ही निर्मित होता है यदि हाइड्रा को उदग्र रूप से काटा जाय तो इससे दो मुँह वाला हाइड्रा निर्मित हो जाता है । पुनरूद्भवन के प्रयोग में यह भी पाया गया कि इसके अग्र भाग में पुनरूद्भवन की क्षमता अधिक तथा पश्च भाग में पुनरूद्भवन की क्षमता कम होती है ।



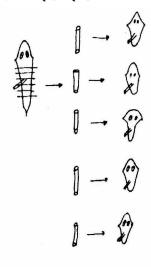
चित्र 9.1 हाइड्रा में पुनरूद्भवन

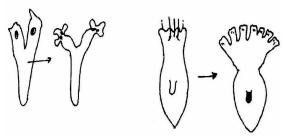
- 9.5.4 प्लेटीहेलमिन्थिज में पुनरूद्भवन- प्लेटीहेलमिन्थिज के सदस्यों में प्लेनेरिया के अलावा अन्य प्राणियों में पुनरूद्भवन की उल्लेखनीय क्षमता नहीं पाई जाती है। नई रचना का आकार पैतृक रचना से थोड़ा छोटा हो जाता है। प्लेनेरिया पर किये गये पुनरूद्भवन प्रयोगों में निम्न प्रेक्षण देखने को मिले है।
- (i) प्लेनेरिया वो खण्डों में धुवता पाई जाती है । इससे पृथक हुए खण्ड के अग्र भाग से सदैव अग्र भाग की रचनाएँ व पश्च भाग से सदैव पश्च भाग के खण्ड निर्मित होते है ।
- (ii) प्लेनेरिया के अलैंगिक प्रभेद में पुनरूद्भवन की क्षमता लैंगिक प्रभेद की तुलना में अधिक होती है ।
- (iii) प्लेनेरिया के अग्र भाग में पुनरूद्भवन की दर पश्च भाग की तुलना में अधिक होती है । पश्च भाग का केवल बड़ा खण्ड पुनरूदभवन दवारा प्राणी का निर्माण करता है ।
- (iv) यदि प्लेनेरिया की उदग्र रूप से V आकृति में काटा जाये तो दो शीर्ष वाला जन्तु निर्मित होता है ।
- (v) पुनरूद्भवन की क्रिया प्रेरक कारक तथा निरोधक कारक द्वारा नियंत्रित होती है।

(vi) पुनरूद्भवन के समय खोये हुए अंगों का निर्माण मुखअपमुख अक्ष के अनुरूप होता है।

9.5.5 निमेटोडा में पुनरूद्भवन - निमेटोडा में पुनरूद्भवन की क्षमता अत्यल्प होती है । इन प्राणियों में पुनरूद्भवन की क्षमता घाव भरने तक ही सीमित होती है । इसका मुख्य कारण शरीर में कायिक कोशिकाओं की संख्या का निश्चित होना है

9.5.6 ऐनेलिडा में पुनरूद्भवन - ऐनेलिडा में पोलीकीटा तथा ओलिगोकीटा के प्राणियों में पुनरूद्भवन पाया जाता है । इसके दो पृथक खण्ड दो जन्तुओं में परिवर्तित हो जाते है । यदि प्राणी को बीच में से काट दिया जाये तो अगला खण्ड तो पीछे के सभी खण्डों का निर्माण कर लेता है परन्तु पश्च भाग आगे के केवल कुछ ही खण्डों का निर्माण कर सकता है ।इन प्राणियों में पुनरूदभवन की क्षमता प्लेनेरिया के समान होती है ।





चित्र 9.2 प्लेनेरिया के विभिन्न भागों से काट के पश्चात् पुनरुद्भवन

9.5.7 आर्थोपोडा में पुनरूद्भवन - इस संघ के प्राणियों में पुनरूद्भवन की अत्यल्प क्षमता पाई जाती है । कीटों में भ्रूणीय अवस्था में ही कम विकसित उपांग निर्मित होते है । क्रस्टेशिया के प्राणियों में पाद का पुनरूद्भवन वयस्क अवस्था में भी हो जाता है । मकडियों तथा केंकडों में स्वांगोच्छेदन की क्रिया पाई जाती है ।टांगों को स्वयं ही पृथक कर देते हैं । इस स्थान पर काइटिनी प्लग से घाव ढक जाता है । यहां पुनरूद्भवन किलका निर्मित होती है जो एपिमोर्फोसिस दवारा नये पाद का निर्माण कर लेती है ।

- 9.5.8 मोलस्का में पुनरूद्भवन अन्य प्राणियों की तुलना में मोलस्का के प्राणियों में पुनरूद्भवन की क्षमता कम होती है । इनमें वृन्त युक्त आँखें, पाद व सिर का कुछ भाग पुन: निर्मित हो जाता है । मस्तिष्क, गैंगलिऑन, शीर्ष के पुनरूद्भवन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है ।
- 9.5.9 इकाइनोडर्मेटा में पुनरूद्भवन इस संघ के प्राणियों मे, कटी हुई भुजाएं तथा केन्द्रीय डिस्क पुन: निर्मित हो जाती है । तारा मछली में यह पाया गया कि यदि इसकी सिर्फ एक भुजा के साथ केन्द्रीय बिम्ब का पांचवा अंश भी हो तो इससे पुनरूदभवन द्वारा सम्पूर्ण प्राणी का निर्माण हो जाता है ।

समुद्री खीरों में गुदा से जुड़ी हुई लाल गुलाबी या सफेद रंग की कुवियर की नालें अवस्कर के फटने से बाहर आ जाती है व जल के सम्पर्क में आने पर चिपचिपा जाल बना लेती है जिससे शिकार फंसकर मर जाता है । इन नलिकाओं में पुन: पुनरूद्भवन हो जाता है ।

- 9.5.10 मछिलयों में पुनरूद्भवन मछिलयों में पुनरूद्भवन क्षमता बहुत सीमित होती है । यदि मछिलयों के फिन्स क्षतिग्रस्त हो जाये तो ये पुनः विकसित हो जाते है ।
- 9.5.11 उभयचरों में पुनरूद्भवन कशेरूकी प्राणियों में एम्फीबिया में पुनरूद्भवन की क्षमता अपेक्षाकृत अधिक होती है । न्यूट तथा सैलामेण्डर के लारवा तथा वयस्क दोनों में क्षतिग्रस्त पाद, पूँछ, बाहय गिल्स, ऊपरी व निचले जबड़े पुन: निर्मित हो जाते है ।

एन्यूरा के प्राणियों में पुनरूदभवन क्षमता बहुत कम होती है । केवल मेंढक के लारवा में ही टूटी हुई पूंछ व पैर पुनरूद्भवन द्वारा पुन विकसित होते है । कायान्तरण के बाद वयस्क में पुनरूद्भवन की क्षमता कम या समाप्त हो जाती है ।

- 9.5.12 सरीसृपों में पुनरूद्भवन छिपकिलयों में स्वांगोच्छेदन की क्रिया पाई जाती है । जिसमें यह अपनी पूँछ तोड सकती है । घाव का स्थान त्वचा से ढक जाता है । यही पर पुनरूद्भवन किलेका बनती है व कुछ दिनों बाद नई पूँछ विकिसत हो जाती है । इस प्रकार निर्मित पूँछ की लम्बाई छोटी होती है इसमें अन्तः कंकाल बहुत सरल प्रकार का होता है तथा शल्क भी सामान्य शल्कों से भिन्न होते है ।
- 9.5.13 पिक्षयों में पुनरूद्भवन पिक्षयों में पुनरूद्भवन की क्षमता लगभग अनुपस्थित होती है केवल इनकी चोंच में ही पुनरूद्भवन पाया जाता है ।
- 9.5.14 स्तनधारियों मे पुनरूद्भवन:- स्तनधारियों में पुनरूदभवन क्षमता बहुत कम होती है जो केवल घाव भरने तक ही सीमित है । यद्यपि अस्थियों तथा कण्डरा में पुनरूद्भवन की क्षमता अधिक होती है । अस्थियों में होने वाली टूट-फूट की मरम्मत स्वयं ही हो जाती है । इसी प्रकार यकृत के छोटे हिस्से को काट दिया जाये तो शेष कोशिकाएं पुनरूद्भवन द्वारा क्षतिग्रस्त कोशिकाओं का निर्माण कर लेती है ।

9.6 पुनरूद्भवन के दौरान आकारिकी घटनायें:

पुनरूद्भवन की क्रियाविधि के लिए यूरोडेला के सदस्यों (न्यूट तथा सैलामेण्डर) पर किये गये पाद पुनरूद्भवन के प्रेक्षणों का वर्णन यहां किया जा रहा है । पाद में पुनरूद्भवन उस समय होता है जब इसे काट दिया जाये अथवा अत्याधिक क्षतिग्रस्त हो जाये । यदि भुजा अत्यधिक क्षतिग्रस्त हो जाये तो इस स्थान पर एक अतिरिक्त भुजा निर्मित हो जाती है । यह घटना

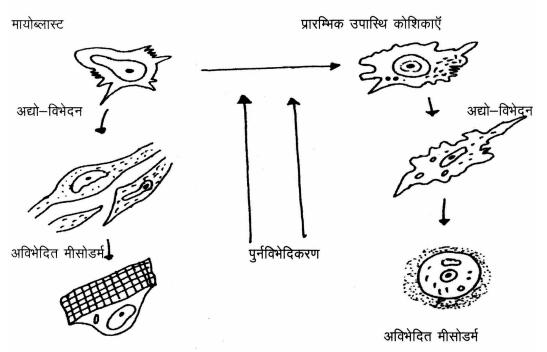
परापुनरूद्भवन कहलाती है। यदि तंत्रिकाएं जन्म से ही भुजाओं में नहीं हो तो इसमे पुनरूद्भवन की क्रिया सम्पन्न होती है। अतः पुनरूद्भवन के लिये आवश्यक है कि काटे गये भाग में पुनरूद्भवन का क्षेत्र उपस्थित हो तथा तंत्रिकाओं से स्त्रावित न्यूरोट्रोपिक कारक भी उपस्थित हो।

9.6.1 घाव के भरने की प्रावस्था अथवा प्रमुकुल पूर्वास्था: अंगोच्छेदन के तुरन्त पश्चात् घाव के भीतर उपस्थित कोशिकाएँ तथा ऊतक सतह पर आ जाते है। कुछ कोशिकाएँ क्षितिग्रस्त हो जाती है क्योंकि प्रितकूल वातावरण उपस्थित होता है। इस प्रकार घाव की सतह इन मृत कोशिकाओं से भर जाती है। क्षितिग्रस्त रक्त वाहिनियों से रक्त का बहना प्रारम्भ हो जाता है। इसमें स्कंदन की क्रिया होती है जिससे रक्त बहना रूक जाता है। त्वचीय उपकला घाव के किनारों से घाव की सम्पूर्ण खुली सतह पर फैल जाती है तथा थक्के के नीचे व संयोजी ऊतक के मध्य पर्त का निर्माण कर लेती है। उपकला का प्रसार कोशिकाओं के विभाजन के कारण होता है। घाव पर उपकला का आवरण निर्मित होने के पश्चात भी एपिडर्मल कोशिकाएं प्रवासन व विभाजन करती रहती है। इस प्रवासन के कारण घाव की सतह पर गुंबद के आकार की टोपी निर्मित हो जाती है। जिसे शीर्ष एरक्टोडर्मल कटक (AER-Apical Ectodermal Ridge) कहते हैं यह AER कुछ समय के लिये आधारित बिल्ली तथा डर्मिस से पृथक रहती है। इस प्रकार 24 घन्टे के अंदर घाव मोटी उपकला द्वारा ढक जाती है जो पारस्परिक (एपीडर्मिस) अधिचर्म से मोटी होती है।

9.6.2 प्रमुकुल निर्माण प्रावस्था:- प्रमुकुल निर्माण प्रावस्था के दौरान घाव पर निर्मित उपकला के नीचे कोशिकाएं अद्यो-विभेदन द्वारा इकट्ठी होना प्रारम्भ हो जाती है । उपकला आवरण तथा इस कोशिकाओं का समूह प्रमुकुल कहलाता है । प्रमुकुल में पाद किलका से सम्बन्धित सभी लक्षण पाये जाते है । इनमे अत्याधिक संगठित रचना के निर्माण वृद्धि तथा विभेदन की क्षमता पाई जाती है । एपिडर्मल कोशिकाएं शीर्ष भाग में लगातार प्रवासन द्वारा एकत्रित होती रहती है साथ ही प्रमुकुल में पहले से उपस्थित कोशिकाएं भी सूत्री विभाजन द्वारा विभाजित होती रहती है मिसेनकायमा कोशिकाएं भी प्रमुकुल स्थल पर एकत्रित होती रहती है । इस प्रकार उपकला मीसेनकाइमा अन्तः क्रिया तंत्र निर्मित हो जाता है यह तंत्र पाद किलका के समान होता है ।

आधुनिक शोधकार्यों में यह पाया गया है कि प्रमुकुल की फाइब्रोब्लास्ट कोशिकाएँ, आन्तरिक ऊतकों से अदयो-विभेदन दवारा निर्मित होती है।

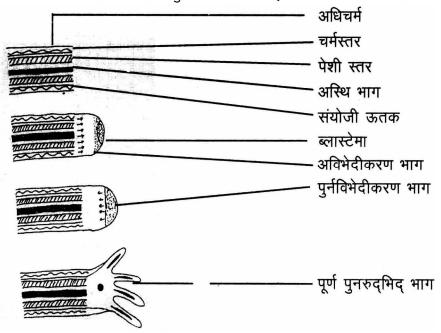
9.6.3 अद्यो-विभेदन प्रावस्था :- अद्यो-विभेदन की क्रिया तंत्रिका तथा रक्त वाहिनियों को छोड़कर सभी में पाई जाती है । अधिकांशतया चर्म, संयोजी ऊतक, मांस पेशियां उपास्थि तथा अस्थियों में यह क्रिया पाई जाती है । औतिकी स्तर पर यह पाया गया कि घाव के समीपस्थ अस्थि, 'उपास्थि, पेशी तन्तु आदि की कोशिका रासायनिक व आकारिकी विशिष्टताएँ समाप्त हो जाती हैं तथा अद्यो-विभेदन द्वारा मीसोडर्मल कोशिकाओं का निर्माण होता है जो कि कोशिका विभाजन के पश्चात् प्रमुकुल या पुनरूद्भवन कलिका का निर्माण करती है । अद्यो-विभेदन की क्रिया तीन प्रकार से हो सकती है ।



चित्र 9 .3 पुनरूदभवन के दौरान कोशिकाओं का अविभेदीकरण

- 9.6.3.1 वास्तविक अद्यो-विभेदन:- इस अद्यो-विभेदन मे परिपक्व पेशियां तथा कार्टिलेज पूर्ण रूप से अविभेदित कोशिकाओं में परिवर्तित हो जाती है।
- 9.6.3.2 आश्रित अद्यो-विभेदन:- इस प्रकार के अद्यो-विभेदन में हासिल होती हु ई उपास्थि तथा पेशियों के उत्पाद अन्य मीसेनकाइम कोशिकाओं को अद्यो-विभेदन हेत् प्रेरित करते हैं।
- 9.6.3.3 आभासी अद्यो-विभेदन- इस प्रकार के अद्यो-विभेदन में कोशिका को भौतिकी रचना परिवर्तित हो जाती है । लेकिन इनके मूलभूत लक्षण परिवर्तित नहीं होते है ।
- 9.6.4 पुनर्विभेदन जब प्रमुकुल एक निश्चित अवस्था में पहुंच जाती है तो अद्यो विभेदन की क्रिया रूक जाती है तथा प्रमुकुल वृद्धि प्रावस्था में प्रवेश करता है जिससे यह पुनर्विभेदित होकर क्षितिग्रस्त ऊतकों तथा अंगों का निर्माण करती है । आन्तिरिक तौर पर ऊतक जनन की क्रिया भी होती हे । पुनर्विभेदन के द्वारा क्रियात्मक उपांगों का पुनः निर्माण हो जाता है । अलग-अलग प्रजातियों में इसकी दर भी अलग-अलग हो सकती है ।
- 9.6.4.1 मेटाप्लेसिया अंगोच्छेदन के पश्चात् कोशिकाएं अद्यो-विभेदन होकर प्रमुकुल का निर्माण करती है तथा अविभेदित हो जाती है । पुनर्विभेदन के दौरान जब अद्यो-विभेदित कोशिकाएं अपनी उत्पत्ति से भिन्न रचनाओं में परिवर्तित हो जाये तो यह पुनर्विभेदन मेटाप्लेसिया कहलाता है । जैसे- उपास्थि कोशिका से अद्यो-विभेदन के पश्चात् बनने वाली मीसोडर्म कोशिका का रूपान्तरण पेशी कोशिकाओं में हो जाये ।
- 9.6.4.2 माडुलन जब. अंगोच्छेदन के पश्चात् कोशिकाएं अद्यो-विभेदन होकर प्रमुकुल का निर्माण करती है तथा अविभेदित हो जाती है । पुनर्विभेदन के दौरान जब निर्विभेदित कोशिकाएं पुन: अपनी उत्पत्ति वाली कोशिकाओं में ही परिवर्तित हो जाये तो यह पुनर्विभेदन माडुलन कहलाता है ।

पुनर्विभेदन के दौरान ही संरचना विकास प्रारम्भ हो जाता है। इस प्रक्रिया में प्रमुकुल की कोशिकाएं तीव्र गित से संख्या में वृद्धि करती है। अतिशीघ्र प्रमुकुल एक शंकु की आकृति ले लेता है। इस अवस्था को शंकु अवस्था कहते है। शंकु अवस्था अंगोच्छेदन के लगभग 20 दिन पश्चात् आती है। शंकु अवस्था से 4-6 दिन पश्चात् प्रमुकुल पृष्ठ अधर सतह से चपटा हो जाता है। इसे पतवार अथवा पिट्टका अवस्था कहते है। अग्रपाद में इसे हस्त पिट्टका तथा पश्च पाद में इसे पद पिट्टका कहते है। पतवार अवस्था के 5- 10 दिन बाद इसके दूरस्थ सिरों पर अंगुलियों के उभार तथा खांच निर्मित होते है। इस अवस्था को खांच अवस्था कहते है। आन्तरिक स्तर पर उतक विभेदन प्रारम्भ हो जाता है। कुछ सप्ताह पश्चात् कटे पाद का निर्माण हो जाता है।



चित्र 9.4 सैलामेन्डर के पाद की पुनरूद्भवन की क्रमिक अवस्थाएँ

9.7 पुनरूद्भवन के दौरान कार्यिकी प्रगतिः

प्नरुद्भवन के दौरान होने वाली कार्यिकी प्रगति को दो भागों में बाँटते है-

- 9.7.1 अपचय प्रावस्था -प्रोटीओलाइटिक एन्जाइम की क्रिया में वृद्धि ।
- (1) स्वतंत्र अमीनों अम्ल की मात्रा में वृद्धि ।
- (2) कोशिका श्वसन में कमी ।
- (3) अपूर्ण ऑक्सीजन के कारण अनऑक्सी ग्लाइकोलाइसिस के परिणामस्वरूप लेक्टिक अस्त का संग्रह होता है।
- (4) श्वसन एन्जाइम जैसे साइटोकोम ऑक्सीडेस का स्तर कम हो जाता है।
- (5) प्रारम्भिक अवस्था में ऑक्सीजन की खपत कम हो जाती है।
- (6) Ph कम हो जाता है।

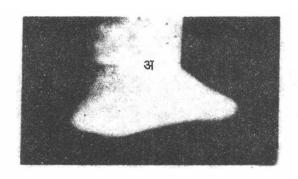
9.7.2 निर्माण व उपचय प्रावस्था -

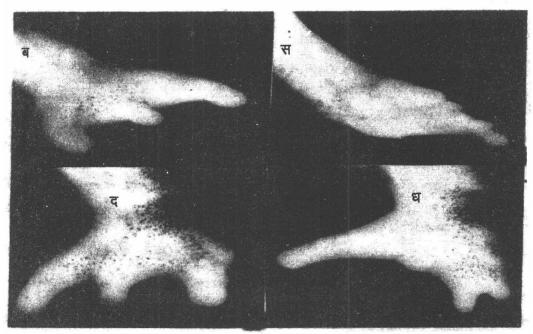
- (1) ऑक्सीकरण की क्रिया में वृद्धि होती है।
- (2) सामान्य pH फिर से प्राप्त कर लिया जाता है।
- (3) श्वसन में वृद्धि होती है।
- (4) लेक्टिक अम्ल की मात्रा में कमी होती है।
- (5) RNA की मात्रा में कमी होती है।
- (6) कोशिका के परिमाप में वृद्धि होती है ।

9.8 रेटिनोयड्स द्वारा पुनरुद्भवन में प्रेरण:

सत्तर के दशक के उत्तरार्द्व में भारत में परिवर्धन जैव विज्ञान में एक प्रमुख खोज हुई वह थी रेटिनोइड अर्थात् विटामिन A एवं उनके व्युत्पन्नों द्वारा पुनरुद्भवन की क्षमता में बढ़ोतरी । यह शोध राजस्थान विश्वविद्यालय के प्रोफेसर इकबाल अहमद नियाजी व उनकी शोध टीम के सदस्यों द्वारा की गई । इस खोज की एक अन्य प्रमुख वैज्ञानिक उपलब्धि थी मेंढक के कटे हुए हाथ व पैर जो पुनरुद्भवन क्षमता खो चुके थे उनमें कटे हुए हिस्से को पुनः उगाने की क्षमता विकसित करना । यह खोज प्रोफेसर के.के.शर्मा द्वारा की गई । जिसमें रेटिनोइड द्वारा हाथ के कटने के पश्चात् कटे हुए हाथ का पुनरुद्भवन हो जाता है । (चित्र 9.5) रेटिनोइड घाव अरने की प्रारंभिक अवस्था में कटे स्थान पर लगाया जाता है । ये दोनों भारतीय खोजों को विश्व में कई प्रयोगशालाओं में पुनरावृति करके देखा तथा विश्व की अन्य उभयचर प्रजातियों में भी रेटिनोइडस के प्रभाव के समान परिणाम प्राप्त हुए ।

रेटिनोइड द्वारा अंग प्रेरण की क्रियाविधि- रेटिनोइड के अंग पुनरूद्भवन व अंग परिवर्धन पर होने वाले प्रभावों पर विस्तृत अध्ययन के पश्चात् यह पाया गया कि यह अणु जीन अभिव्यक्ति को प्रभावित कर कोशिकाओं की परिवर्धनात्मक क्षमताओं में वृद्वि करती है साथ ही वे प्रतिकूल कारक जो कि पुनरूद्भवन को रोकने में अपनी भूमिका निभाते हैं उनके प्रभाव को रोकता है । रेटिनोइड्स के स्तनियों पर होने वाले पुनरूद्भवन खोज परिणामों से ऐसी उम्मीदें की जा सकती है कि आने वाले समय में यह अणु मनुष्य के कटे हुए हाथ व पैरों के पुनरुद्भवन में एक महत्वपूर्ण उपचार साबित होगा ।





चित्र 9.5 - चित्र अ में मेंढक का हथेली से कटा हुआ हाथ दर्शाया गया है तथा चित्र ब, स, द, ध, में रेटिनोइरु उपचार के पश्चात् उंगलियों के पुनरुद्भवन को दर्शाया गया है। (सौजन्य से-प्रोफेसर के. के. शर्मा, प्राणी शास्त्र विभाग, महर्षि दयानन्द सरस्वती विश्वविद्यालय, अजमेर, राजस्थान: (K.K Sharma and I.A.Niazi,1979 Regeneration induced in the fore limbs by treatment with vitamin A in the froglets of Rana breviceps. Experientia (Switzerland) vol 35pp 1571 -72.)

9.9 सारांश:

इस इकाई में हम खोये हुए अंगों को पुन: प्राप्त करने की जैविक क्षमता के बारे में जानकारी प्राप्त करेंगे पुनरूद्भवन एक जटिल प्रक्रिया है जिसकी सहायता से प्राणी अपने खोये या नष्ट अंगो को पुन: प्राप्त कर लेते हैं । प्राणी जगत में विभिन्न संघो में पुनरूदभवन क्षमता पाई जाती है तथा यह अकशेरूकी से कशेरूकी तक किस प्रकार घटती जाती है। साथ ही यह जानेंगे कि पुनरूद्भवन प्रक्रिया के दौरान क्या-क्या आकारिकीय तथा कार्यिकी परिवर्तन होते है। किसी नष्ट भाग / अंग पर हम स्तंभ कोशिकाओं का आरोपण कर दे तो वे स्तम्भ कोशिकाएँ उस नष्ट भाग या अंग का पुनःउत्पादन करने में भी सक्षम है इस प्रकार की जीवित कोशिकाओं की सहायता से किसी ऊतक या अंग की मरम्मत करना कोशिका तकनीक कहलाती है तथा इन्हें मरम्मतकारी कोशिका औषधी भी कह सकते है।प्राणियों में पुनरूद्भवन की विभिन्न क्षमताएँ पाई जाती हैं। इस आधार पर पुनरूद्भवन के निम्न मुख्य प्रकार है:-कार्यिकी पुनरूद्भवन, अभिरूपान्तरण पुनरूद्भवन, अंगान्तरण पुनरूद्भवन, विषमान्तरण पुनरूद्भवन, परापुनरूद्भवन.प्राणी जगत में यह विशेषता प्रोटोजोआ से लेकर उच्च कशेरुकी प्राणियों में पाई जाती है। कई प्राणियों में यह सम्पूर्ण शरीर में तथा कई में यह किसी विशिष्ट 'भाग में ही पाई जाती है।पुनरूद्भवन की प्रक्रिया के दौरान कोशिकाओं में कई उपापचय परिवर्तन होते है। जहाँ पुनरूद्भवन की क्षमता समाप्त हो जाती है रेटिनोल पॉमिटेट के द्वारा कटे हुए अंगों में पुनरूद्भवन प्रेरित किया जा सकता है।

9.10 शब्दावली :

- 1. पुनरूद्भवन :- जीव शरीर में खोये हुए या नष्ट हुए अंगों की पुनःप्राप्ति ।
- 2. स्वांगोच्छेदन:- यह आर्थ्रोपोडा में कीट समूह की प्रमुख विशेषता है जिसमें कीट अपने शरीर के पादों को पृथक-पृथक कर लेते है ।
- 3. काइमेरिक कोशिकाएं:- अविभेदित तथा अनियंत्रित कोशिकाओं का समूह जिसमें अलग-अलग जीनी संरचना वाली कोशिकाएं उपस्थित रहती है ।

9.11 संदर्भ ग्रंथ:

- वर्टीब्रेट लिम्ब रीजनरेशन : एच.वेलेस
- डवलपमेन्टल बायोलोजी : स्कॉट एफ. गिलबर्ट
- लिम्ब डवलपमेन्ट एण्ड रीजनरेशन : फालोन, केली, स्टॉकम ,गोयथिनक

9.12 बोध प्रश्न :

1.	कटे हुए अंगों के पुनः प्राप्ति की प्रकिया को कहते है ।
	अ. पुनरूद्भवन ब. स्त्रावण स. कोशिका विभाजन द. कोशिका चक्र
2.	अधो विभेदन द्वारा कोशिकाएँ प्राप्त होती है ।
3.	प्लेनेरिया में शरीर के किसी भी हिस्से से द्वारा पूर्ण शरीर का निर्माण
	हो सकता है ।
4.	मानव रक्त में उपस्थित आर. बी. सी. की जीवनावधि दिन होती है।
5.	हाइड्रा में तंत्रिका कोशिका का निर्माण करने वाली कोशिका में विभेदन से
	पहले होता है जबिक निमेटोसिस्ट में विभेदन के
	पश्चात होता है ।

- 6. रेटिनोइड अणु द्वारा अंग पुनरूद्भवन..... नामक वैज्ञानिक व उनके सहयोगियों की खोज है।
- 7. ट्रेम्बले ने..... पर प्नरुद्भवन से सम्बन्धित प्रयोग किये ।
- 8. आथ्रोपोडा समूह के...... तथा...... में स्वांगोच्छेदन की किया पाई जाती है ।
- 9. पुनरूद्भवन की क्षमता सें बढ़ोतरी करने वाला कारक है-
 - अ. प्रोटीन ब. विटामिन ए एवं व्युत्पन्न स. कार्बोहाइड्रेट द. वसा
- 10. रक्त कोशिकाओं का निर्माण होता है
 - अ. अस्थि मज्जा में
- ब. आंत में
- स. पित्ताशय में
- द. वृक्क में
- 11. पर्किन्सन रोग किस की कमी से होता है
 - अ. हिपेरिन

ब. डोपेमिन

स. इन्सुलिन

- द. उपरोक्त सभी
- 12. पूर्णशक्त कोशिकाएं क्या है ।

9.13 अभ्यासार्थ प्रश्नः

- 1. पुनरुद्भवन क्या है । इसके प्रकारों का वर्णन करो ।
- 2. मरम्मतकारी औषधियों के विषय में संक्षिप्त लेख लिखिए ।
- 3. प्नरुद्भवन के प्रकारों का विस्तृत वर्णन कीजिए ।
- 4. स्वांगोच्छेदन को परिभाषित कीजिए।
- 5. माडुलन को परिभाषित कीजिए ।
- 6. निम्नतर कशेरुकी प्राणियों में पुनरूद्भवन को समझाइए ।
- 7. पुनरूद्भवन प्रक्रिया मे घटित होने वाले आकारिकी परिवर्तनों को स्पष्ट करो ।
- 8. पुनरूद्भवन के दौरान कोशिका मे क्या- क्या उपापचयी परिवर्तन होते है ।
- 9. रेटिनोइक अम्ल प्नरुद्भवन प्रक्रिया को किस प्रकार प्रभावित करता है ।
- 10. क्या मनुष्य के कटे अंगों का पुनरूद्भवन संभव है? पुनरूद्भवन प्रकिया के आधार पर समझाइए।

इकाई - 10

प्राणियों की क्लोनिंग । क्लोनिंग के प्रकार । भ्रूण-स्थानान्तरण तकनीक । निम्न ताप संरक्षण । ANIMAL CLONING. TYPES OF CLONING. EMBRYO TRANSFER TECHNIQUE. CRYO-PRESERVATION.

इकाई की रुपरेखा

- 10.0 उद्देश्य
- 10.1 प्रस्तावना
- 10.2 क्लोनिंग
- 10.3 क्लोनिंग के प्रकार
 - 10.3.1 जीन क्लोनिंग
 - 10.3.2 कोशिका क्लोनिंग
 - 10.3.3 भ्रूणीय क्लोनिंग
 - 10.3.4 सम्पूर्ण जीव क्लोनिंग
- 10.4 भ्रूण स्थानान्तरण
- 10.5 भ्रूण स्थानान्तरण की प्रक्रिया
- 10.5 भ्रूण की प्राप्ति
- 10.6 मानव में भ्रूण स्थानान्तरण
- 10.7 निम्न ताप परिरक्षण
- 10.8 निम्न ताप परिरक्षण की तकनीक
- 10.9 सारांश
- 10.10 शब्दावली
- 10.11 सन्दर्भ ग्रंथ
- 10.12 बोध प्रश्न
- 10.13 अभ्यासार्थ प्रश्न

10.0 उद्देश्य:

प्राणी क्लोनिंग से अभिप्राय है प्राणियों के लैंगिक जनन विधि को प्रयोग में लिए बिना उसके प्रतिरुप तैयार करना । इस इकाई का उद्देश्य प्राणियों में क्लोनिंग, क्लोनिंग के प्रकार, भ्रूण स्थानान्तरण तकनीक तथा शीत परिरक्षण आदि के बारे में समझना हैं । ये तकनीकें विभिन्न उच्च आनुवांशिकी प्राणियों के प्रतिरूप बनाने हेतु काम में आती है जिससे कि उत्कृष्ट जीनोम युक्त प्राणियों के अधिकाधिक प्रतिरूप बनाये जा सकें ।शीत परिरक्षण द्वारा क्लोन की हुई कोशिका, था आदि को लम्बे काल तक उपयोग में लाया जा सकता है जिन्हें कि सम्पूर्ण जीव क्लोनिंग के उपयोग में लिया जाता है । इस इकाई में शीत परिरक्षण के बारे में भी अध्ययन करेंगे ।

10.1 प्रस्तावना :

प्राणियों में लैंगिक प्रजनन के दौरान मादा युग्मक का निषेचन नर युग्मक द्वारा होता है । लैंगिक प्रजनन द्वारा सजीवों के आनुवांशिक गुणों को नियत बनाये रखा जाता है । गर्भाशय में भ्रूण का परिवर्धन एवं प्रसव क्रिया सामान्य रूप से संपन्न होती है । मानव समष्टि में निरन्तर वृद्धि के कारण इनकी अन्य प्राणियों के ऊपर निर्भरता निरंतर बढ़ती जा रही है । अतः इन प्राणियों की प्राकृतिक प्रजनन दर कम होने के कारण जैवतकनीकी की युक्तियों द्वारा इस समस्या का समाधान किया जा सकता है ।

प्रागैतिहासिक काल से ही मनुष्य प्राणियों की नस्ल सुधार हेतु अनेक युक्तियां प्रयोग में लेता आ रहा है । अच्छी नस्ल वाले प्राणियों के मध्य समागम करवाकर उचित गुणों वाली संतित का निर्माण, वर्तमान में भी किया जा रहा है । लेकिन प्राकृतिक प्रजनन दर कम होने के कारण उन नवीन तकनीकों एवं युक्तियों का विकास किया जा रहा है जिनके द्वारा बिना लैंगिक जनन के किसी प्राणी के एक से अधिक प्रतिरुप या क्लोन बनाए जा सकें । इन नवीनतम विधियों में जैव तकनीकी की निम्न युक्तियों को प्रयोग में लिया जाता है ।

- 1. वीर्य का संग्रह
- 2. x a y शुक्राणुओं का पृथक्करण
- 3. शीत परिरक्षण
- 4. श्क्राण् योग्यतार्जन
- 5. कृत्रिम वीर्य सेंचन
- 6. अण्डलयन का प्रेरण
- 7. मदचक्र का नियंत्रण
- 8. सुपर ओव्यूलेशन
- 9. भ्रूण स्थानान्तरण
- 10. पात्र निषेचन
- 11. भ्रूणीय क्लोनिंग
- 12. भ्रूणीय लिंग परिवर्तन
- 13. अनिषेक जनन
- 14. गर्भ निदान
- 15. प्रेरित प्रसव
- 16. प्रेरित दुग्ध स्त्राव

- 17. ट्रासजैनिक प्राणियों का निर्माण
- 18. केन्द्रक स्थानान्तरण
- 19. भ्रणीय स्तंभ कोशिका आदि

10.2 क्लोनिंग:

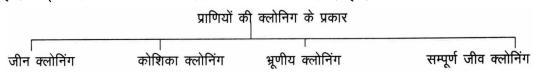
एकल कोशिका के विभाजन से प्राप्त कोशिका समूह को क्लोन कहा जाता है । क्लोन एक ग्रीक शब्द है जिसका तात्पर्य है शाखा, जैसे एक वृक्ष की सभी शाखाएँ समान होती हैं वैसे ही क्लोन की सभी कोशिकाएं समान होती है । अतः क्लोन एक जनक (पिता या माता) से अलैंगिक जनन द्वारा प्राप्त प्रतिलिपि है जिन्हें संतित नहीं माना जा सकता, क्लोन बनने की प्रक्रिया को क्लोनिंग कहते हैं ।दूसरे शब्दों में जीनी रुप से समान या समान जीन संरचना वाले प्राणियों का निर्माण ही क्लोनिंग कहलाता है ।

10.3 क्लोनिंग के प्रकार:

क्लोनिंग एक व्यापक शब्द है । क्लोनिंग मुख्य रूप से निम्न प्रकार की होती है ।

10.3.1 जीन क्लोनिंग-

- वर्तमान में इच्छित जीन की किसी उपयुक्त वाहक के द्वारा क्लोनिंग की जाती है । इनको क्लोन बैंक भी कहते है । इस प्रकार की क्लोनिंग जीन के अध्ययन के लिये की जाती है । जीन क्लोनिंग एक समान DNA है क्रम की कई प्रतिलिपियाँ बनाना जीन क्लोनिंग कहलाता हैं ।
- आवश्यक जीन को रेस्ट्रिकशन एन्जाइम की सहायता से पृथक किया जाता है । यह जीन दाता DNA है या पैसेन्जर DNA कहलाता है ।
- इस जीन या DNA खण्ड को क्लोनिंग वेक्टर में निवेशित करवाया जाता है यह वेक्टर वाहक जीवाण् (Bacteria) या बैक्टीरियोफेज हो सकता है ।
- यह जीन वाहक के DNA के साथ पुनर्योजी DNA में बनाता है ।
- इस वाहक को किसी पोषक कोशिका जो कि जीवाणु हो सकती है, में प्रवेश कराया जाता है ।
- पोषक जीवाणु कोशिका का संवर्धन करने पर ये पोषक अपनी संतित को जन्म देते हैं जिनमें इनके स्वयं के जीन्स के साथ- साथ दाता कोशिका के जीन भी उपस्थित होते हैं ।
- पोषक कोशिका के साथ ही दाता कोशिका के जीनों की प्रतिकृतियाँ या इनके उत्पाद प्रोटीन एन्जाइम आदि बनाते हैं।
- 10.3.2 कोशिका क्लोनिंग किसी प्राणी के शरीर से प्राप्त कोशिकाओं को संवर्धन माध्यम में लगातार जीवित रखने के पश्चात कुछ कोशिकाएं कोशिका रेखा (Cell Line) बनाती है उदाहरणार्थ He La केशिका रेखा. वे कोशिका रेखाएँ है जिनका निरंतर संवर्धन किया जा सकता है तथा इन पर विभिन्न जैव चिकित्सीय प्रयोग किए जा सकते हैं।



10.3.3 भूणीय क्लोनिंग - मनुष्यों के युग्मनज में नियामक प्रकार का परिवर्धन पाया जाता है । यदि युग्मनज में प्रथम तीन विदलन द्वारा उत्पन्न कोरकखण्डों को पृथक कर दिया जाये तो प्रत्येक कोरकखण्ड नवजात शिशु में परिवर्धित हो जाता है । इस प्रकार निर्मित भ्रूण एक समान होते है । यद्यपि ये माता-पिता के क्लोन नहीं है लेकिन ये एक- दूसरे के क्लोन है । यह विधि भ्रूण क्लोनिंग कहलाती है ।

10.3.4. सम्पूर्ण जीव क्लोनिंग - जैव तकनीक से प्राप्त अत्यन्त असाधारण उपलब्धि क्लोन है । क्लोन उस जीव को कहते हैं जो एक अकेले जनक से बिना लैंगिक विधि से उत्पन्न कराया जाता है । यह उस जनक से रंगरुप व गुणों से पूर्णतया समानता रखता है जिससे इसे उत्पन्न किये जाने हेतु एक कोशिका प्राप्त की जाती है तथा यह प्रकिया जीव क्लोनिंग कहलाती हैं । सम्पूर्ण जीव क्लोनिंग दो प्रकार की होती है ।

- पादप क्लोनिंग इस तकनीक के अन्तर्गत एक पादप कोशिका को दूसरे पादप ऊतक या कोशिका से सम्मिलित करवा कर उन्नत गुणों वाले क्लोन पादप प्राप्त किये जा सकते है ।
- पशु क्लोनिंग- इसके अन्तर्गत किसी मादा पशु से अण्ड प्राप्त कर उसे केन्द्रक विहिन कर दिया जाता है तथा उसी मादा या अन्य पशु की किसी कोशिका जिसमें गुणसूत्र द्विगुणित अवस्था में हो, को इलेक्ट्रो फ्यूजन विधि द्वारा केन्द्रक विहिन अण्ड से मिला दिया जाता है । जैसे ही इस द्विगुणित केन्द्रक युक्त अण्ड में विदलन शुरु होता है इसे किसी मादा के गर्भाशय में प्रत्यारोपित कर दिया जाता है जहां इसका आगे का परिवर्धन पूर्ण होता है तथा जिस मादा के गर्भाशय में निषेचित अण्ड का रोपण करते है उसे सरोगेट माता कहते है । उत्पन्न होने वाला क्लोन पशु, दाता के समान होता है उसकी जीनी संरचना दाता के समान होती है उसकी जीनी संरचना में सरोगेट माता का कोई योगदान नहीं होता है । पशु क्लोनिंग की सहायता से गाय, भेड़ इत्यादि अन्य पशुओं की उत्पत्ति की जा चुकी है ।

10.4 भ्रूण स्थानान्तरणः

उचित लक्षणों वाले दाता से ग्राही (Recepient or foster mother) में भ्रूण का प्रतिस्थापन भ्रूण स्थानान्तरण कहलाता है । इस विधि में अल्प समय में अच्छे गुणों वाली संतितयों को प्राप्त किया जा सकता है । सामान्यतया गायों में एक प्रजनन काल में एक बच्चे की प्राप्ति होती है एवं इसकी संपूर्ण जीवनाविध में 9-10 बच्चों की प्राप्ति हो सकती है । लेकिन भ्रूण स्थानान्तरण विधि द्वारा एक वर्ष में 4-5 बच्चों की प्राप्ति हो सकती है । इस विधि में लैंगिक रूप से परिपक्व मादा को हॉर्मोन का इंजेक्शन दिया जाता है तािक अधिक संख्या में अण्डाणुओं का निर्माण हो । इन अण्डाणु को कृत्रिम वीर्य सेंचन द्वारा मादा की फैलोपियन नित्का में निषेचित किया जाता है । निषेचित युग्मनजों को आरोपण से पहले पृथक करके, मद चक्र या रज चक्र के अनुरूप तुल्यकािक ग्राही मादा में स्थानान्तरित कर दिया जाता है । इस प्रकार निषेचित युग्मनज का सामान्य रूप से परिवर्धन होता रहता है लेकिन ग्राही मादा का इसमें किसी प्रकार का आन्वांशिक योगदान नहीं होता है ।

भ्रुण स्थानान्तरण के पद

दाता व ग्राही का चयन व व्यवस्थापन

T

दाता व ग्राही की अति अंडता और मदचक्र समकालिकता



दाता का वीर्य संग्रहण



भ्रूण का संग्रहण



भ्रूण की विशिष्टता जांच व संग्रहण



ग्राही में भ्रूण का स्थानान्तरण

10.5 भ्रूण स्थानान्तरण की प्रक्रिया:

इस तकनीकी में सर्वप्रथम अच्छे गुणों वाली फरटाइल मादा का चयन किया जाता है। इन चयनित मादाओं का ब्र्सेलस (Brucellus) ट्यूबरक्लोसिस ट्यूमर एवं अन्य रोगों हेतु ऋणात्मक परीक्षण किया जाता है। अर्थात् इनमें किसी भी प्रकार का रोग एवं व्याधि नहीं होनी चाहिए। ग्राही तथा दाता दोनों में मद चक्र (Estrous cycle) का नियमन होना चाहिये। मद चक्र के नियमन हेतु निम्न युक्तियों को काम में लिया जाता है।

- (i) **प्राकृतिक चयन -** इस विधि में उन मादाओं का चयन किया जाता है । जिनका आवेग काल तुल्यकालिक होता है ।
- (ii) कृत्रिम विधि द्वारा इस विधि में निम्न युक्तियों को काम में लिया जाता है ।

त्वचा के नीचे सिन्क्रोमेट - B को आरोपित किया जाता है एवं नोरगेस्ट्रोमेट एस्ट्राडायोल की 2ml. मात्रा का इंजेक्शन दिया जाता है । दस दिन पश्चात् आरोपण को हटा दिया जाता है एवं प्राणी में 35 घण्टे पश्चात् आवेग का प्रदर्शन होता है । ग्राही मादा की योनी में PRID (Progesterone releasing intravaginal device) को रख दिया जाता है । इसे दस दिन के पश्चात् हटा दिया जाता है । दो से चार दिन पश्चात् मद चक्र

प्रारंभ हो जाता है । F_2 प्रोस्टोग्लैण्डिन का इंजेकशन देने पर दो से चार दिन पश्चात् मद चक्र प्रारंभ हो जाता है । मद चक्र को नियमित करने के लिये निम्न में से किसी भी विधि को काम में लिया जा सकता है ।

प्रजाति

भैंस

दवा मात्रा

35 -50 मि.ग्राम एन 1 एच

दैनिक प्रक्रिया

4 or 5 दिन

एफ.एस.एच-पी

अवरोही / स्थिरांक

दवा प्रारंभ करने का समय मदचक्र के 9 से 12 दिन के बीच

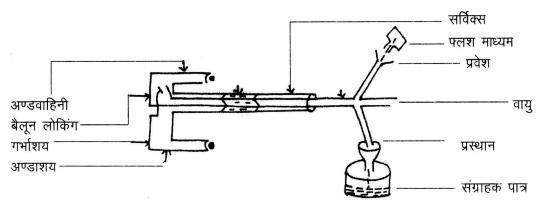
मद चक्र के नियमित होने के पश्चात् वीर्य बैंक से शीत परिरक्षित किये हुये अच्छे गुणों वाले वीर्य को लिया जाता है । इसे 35°C पर द्रवित किया जाता है एवं वीर्य सेवन की छड़ में इसे प्रवेश कराया जाता है । वीर्य को गर्भाशय में प्रविष्ठ कराया जाता है । 12 घंटे के नियमित अंतराल से दो या तीन बार वीर्य सेवन किया जाता है तािक निषेचन की प्राथमिकता बढ़े ।

10.5.1 भ्रूण की प्राप्ति :

भ्रूण की प्राप्ति शल्य क्रिया के बिना की जाती है। कोर्पोरा ल्यूटिआ की संभावित संख्या का आकलन अण्डाशय के स्पंदन द्वारा किया जा सकता है। सरवाइकल प्रसरक को ग्रीवा में प्रविष्ट कराया जाता है। इसमें से उचित व्यास वाले कैथेटर को प्रवेश कराया जाता है। कैथेटर को दाहिने अथवा बांये शृंग में इस प्रकार डाला जाता है कि कैथेटर का बैलून, गर्भाशयी शृंगों के द्विशाखन के अग्र भाग में उपस्थित होता है। एक सिंरिज को इसके साथ जोड़ दिया जाता है तथा बैलून में वायु प्रविष्ट कराई जाती है जिससे मृग अवरूद्ध हो जाते है। अब कैथेटर को प्लग लगाकर बंद कर दिया जाता है। अब पूरे सिस्टम को डलबेको फास्फेट बफर सेलाइन (0.4% lyophilized BSA) से धोया जाता है। इस हेतु लगभग 500-700 मिली तरल का उपयोग किया जाता है एवं आस्टिन को पिचकाकर हवा बाहर निकाल दी जाती है तथा स्टीरियो माइक्रोस्कोप द्वारा भ्रूण का प्रेक्षण किया जाता है। भ्रूण के आकारिकी लक्षणों के आधार पर इन्हें पांच श्रेणियों में रखा जाता है।

तालिका 1. आकारिकी के आधार पर भ्रूणों के प्रकार

क्रम संख्या	भ्रूण के प्रकार	लक्षण
1.	श्रेष्ठ	इस अवस्था के लिए श्रेष्ठ भ्रूण ।ब्लास्टोमियर का समान
		आकार साथ ही एक जैसा रंग व अकृति । यह न तो
		ज्यादा हल्के होते हैं और न ही ज्यादा गहरे । कोशिका
		द्रव्य दानेदार नहीं होता है और साथ में कुछ मध्यम
		आकार की धानियाँ पाई जाती है । इसमें पेरिवेन्टीक्लर
		स्थान रिक्त पाया जाता है तथा एक समान व्यास का
		पाया जाता है तथा एक समान व्यास का पाया जाता है।
		जोनापेल्युसिडा एक समान तथा न तो झुरींदार और न ही
		पिचकी अवस्थामें होती है ।



चित्र 10.1 भ्रूण स्थानान्तरण की तकनीक

क्रम संख्या	भ्रूण के प्रकार	लक्षण
1.	उत्तम, तीन अपूर्णताएँ जैसे कि	कुछ छोटे निष्कासित ब्लास्टोमियर तथा
	एक अंडाकार जोन,	कुछ असममित होते है ।
2.	संतोषजनक निश्चित परंतु बिना	जैसे कि मध्यम संख्या में निष्कासित
	समस्या के	ब्लास्टोमियर, छोटा आकार तथा कम
		विकृतिकरण पाया जाता है
3.	न्यून.	कुछ विकृतधानी कोशिकाएं जिनका कोशिका
		आकार विभिन्न प्रकार के तथा छोटे ।
4.	बहु त कमजोर	बहुत सारे विकृत अनिषेचित तीन
		कोशिकीय युक्त तथा कोशिका
		अवशिष्ट,जीवाणविक अशुद्धियुक्त।

डॉली (Dolly The First mammalian Clone) डॉली की क्लोनिंग इयान वेलमुट एवं उनके साथियों ने की थी। इन्होंने 6 वर्ष की एक वयस्क भेड़ कि स्तन ग्रंथि से विभेदित कोशिकाओं को पृथक किया एवं विशिष्ट संवर्धन माध्यम में इन्हें रखा गया। इसके उपरान्त एक अंडज को अण्डाशय से पृथक कर इसे भी संवर्धन माध्यम में रखा गया। अण्डे के केन्द्रक को माइक्रोपिपेट की सहायता से निकाल दिया गया मंद प्रकार के विद्युत आघात से दोनों कोशिकाओं को मिला दिया गया। इससे विभेदित केन्द्रक ने अविभेदित कोशिकाद्रव्य के साथ अंत क्रिया प्रारम्भ कर दी।

इस अण्डे में सामान्य युग्मनज के समान विदलन प्रारम्भ हो जाता है। ब्लास्टोसिस्ट या 16 कोरक खण्ड अवस्था में इसे फोस्टर मादा (Foster female) में आरोपित कर दिया जाता है। यह प्रयोग स्कॉटलेंड में वैज्ञानिक वेलमुट ने किया। अंत में फरवरी 1996 में स्वस्थ डॉली भेड़ का जन्म हुआ। इसमें फॉस्टर मादा व केन्द्रक विहीन अण्डा प्रदान करने वाली मादा में किसी के भी लक्षण मौजूद नहीं थे क्योंकि इनमें इनका आनुवांशिक योगदान नहीं था। केवल जिस भेड़ की कोशिका से केन्द्रक लिया गया था, उसके लक्षण इसमें उपस्थित थे। अतः डॉली के केवल एक ही

पैतृक था तथा इसकी उत्पति को अलैंगिक प्रकार की मानते है । इयान वेलमुट ने इस प्रकार के 277 केन्द्रकों का प्रत्यारोपण किया । इसमें केवल 29 में विदलन प्रारंभ हुआ । इनमें से केवल 13 भ्रूण का फोस्टर मादा में सफलता पूर्वक स्थानान्तरण किया गया तथा मात्र एक डॉली भेड़ का निर्माण हुआ । अतः इस प्रयोग की सफलता की दर 1 प्रतिशत से भी कम है । इस प्रयोग के आधार पर वेलमुट ने निम्न निष्कर्ष निकाले ।

- विभेदित कोशिका के जीन में अंतर्निहित पूर्णशक्तता पाई जाती है ।
- विभेदित केन्द्रक व अविभेदित कोशिकाद्रव्य के मध्य अंतःक्रिया के कारण कोशिका पूर्ण शक्त हो जाती है ।
- संभवतया केन्द्रक विहीन अण्डे का कोशिका द्रव्य प्रत्यारोपित केन्द्रक को पूर्णशक्त बना देता
 है।
- केन्द्रक प्रत्यारोपण के पश्चात् होने वाले विदलन का नियंत्रण अण्डे के कोशिकाद्रव्य से होता
 है।
- इस विधि दवारा निर्मित क्लोन में लैंगिक परिपक्वता भी आती है।

क्लोन माता

- 1998 में डॉली ने एक नवजात को जन्म दिया जिसका नाम बॉनी रखा
- डॉली मे जीर्णता की प्रक्रिया अत्यधिक तीव्र थी जिसके कारण डॉली की मृत्यु हो गई ।
 इस प्रयोग के बाद जैव प्रौधोगिकी के क्षेत्र में प्राणी क्लोनिंग को लेकर विभिन्न प्रयोग किए गए

अण्ड मादा

केन्द्रक (2N)

बिशेष विलयन

संवर्धन माध्यम

विकेन्द्रित अण्डा
अण्डे दाता केन्द्रक का ग्रहण

विध्रुत का मंद झटका

ब्लास्टोसिस्ट का गर्भाशय में आरोपण

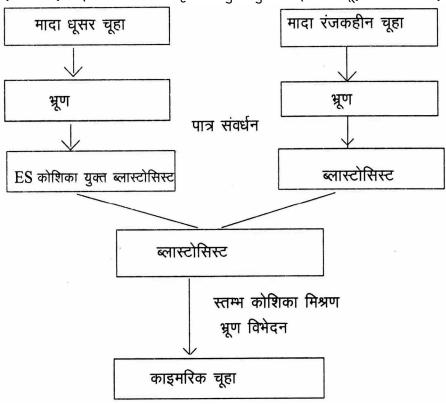
चित्र 10.2 क्लोनिंग विधि द्वारा डॉली भेड़ का निर्माण

क्लोनिंग विधि द्वारा सम्पूर्ण जीव के निर्माण की जो प्रमुख समस्या है वह यह है कि इस विधि में नए आनुवांशिक पुर्नयोजन का अभाव होता है जिसके कारण क्लोन को वातावरण में होने वाले परिवर्तनों से संघर्ष करने में कठिनाई आती है परन्तु यदि आनुवांशिक पुर्नयोजीकरण द्वारा एक अच्छे सुगठित जीव का क्लोन तैयार किया जाता है तो यह क्लोन कई वर्षा तक हमें अच्छी नस्ल

के जीव उपलब्ध करा सकता है तथा प्राणी जैव प्रौधोगिकी तकनीकों के द्वारा आवश्यकता पड़ने पर जीनोम में पुर्नयोजन भी किया जा सकता है ।

भूणीय स्तम्भ कोशिका द्वारा क्लोनिंग

चूहों में केन्द्रक प्रत्यारोपण द्वारा क्लोनिंग संभव नहीं हैं । यह स्पष्ट है कि प्रथम भ्रूणीय विभाजन के प्रारम्भ होने से पहले विभेदन की प्रक्रिया प्रारम्भ हो जाती है । अतः चूहों की क्लोनिंग भ्रूणीय स्तम्भ कोशिका के द्वारा की जाती है । भ्रूण की आंतरिक कोशिकाएं अविभेदित एवं पूर्णशक्त होती है । इन्हे भ्रूणीय स्तम्भ कोशिका कहते है । I LIF(Leukaemia inhibitory factor) कारक द्वारा भ्रूणीय स्तम्भ कोशिका का निर्वहन किया जाता है । इन कोशिकाओं का ट्रांसजेनिक प्राणियों के उत्पादन में महत्वपूर्ण योगदान है । इन स्तम्भ कोशिका को ब्लास्टोसिस्ट में उपस्थित कोरक गुहा में प्रत्यारोपित कर दिया जाता है । ये कोशिकाएं ब्लास्टोसिस्ट के साथ मिश्रित हो जाती है । इस कारण चार पैतृको के गुणों युक्त काइमेरिक चूहों का निर्माण होता है ।

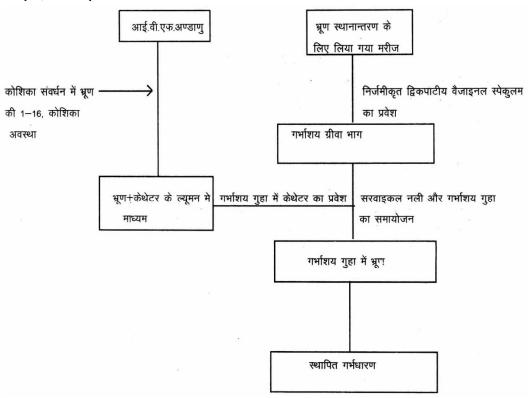


चित्र 10.3 भूणीय स्तम्भ कोशिका मिश्रण द्वारा काइमेरिक चूहे का निर्माण

10.6 मानव में भ्रूण स्थानान्तरण:

वीर्य संचयन के समय ऊसाइट युक्त संवर्धन माध्यम को वीर्य युक्त तरल के साथ मिश्रित किया जाता है । ऊसाइट का 12-13 घण्टे तक लोचन किया जाता है । इनको पेट्रिडिश में प्रेक्षित किया जाता है । 24-30 घण्टे पश्चात् प्रथम विदलन प्रारंभ हो जाता है । भ्रूण स्थानान्तरण के लिए 1 -16 कोशिकीय प्रावस्था अधिक उपयुक्त होती है । गर्भाशय में स्थानान्तरण के पश्चात् भी उत्तरजीविता की दर बहुत कम होती है । अतः कई बार एक से

अधिक भ्रूण का स्थानान्तरण किया जाता है । स्थानान्तिरत भ्रूण फैलोपियन निलका में 8-16 कोशिका तक रूकता है । इसके पश्चात् यह गर्भाशय की तरफ प्रवास करता है । भ्रूण स्थानान्तरण की क्रिया आपरेशन थियेटर में की जाती है । किसी भी प्रकार के निश्चेतक का उपयोग नहीं किया जाता है लेकिन भ्रूण स्थानान्तरण से पहले 10mg डायजेपाम की गोली दी जाती है । भ्रूण को सर्वाइकल कैनाल के द्वारा स्थानान्तिरत किया जाता है । इस बात को सुनिश्चित किया जाना चाहिये कि भ्रूण का स्थानान्तरण हु आ है अथवा नहीं । केथेटर को सही प्रकार से प्रवेश नहीं कराने पर या माध्यम में अधिक तरल लेने पर फैलोपियन निलका में आरोपण हो जाता है अथवा भ्रूण का पुनः बाहर निष्कासन हो जाता है । भ्रूण स्थानान्तरण के पश्चात मादा को 4-7 घंटे तक विश्राम दिया जाता है तथा 10 दिन तक समागम न करने की सलाह दी जाती है ।



चित्र 10.4 मनुष्य में भ्रूणीय स्थानान्तरण की रुपरेखा

क्लोनिंग के चिकित्सीय लाभ-

जीर्णता ,खान-पान व पर्यावरणीय कारको के कारण प्राणी के विभिन्न ऊतको तथा अंगो की कार्य प्रणाली व क्षमता धीरे-धीरे कम होती जाती है । अंत में अंग कार्य करना बंद कर देते है तो हमारा प्रयास यह रहता है कि किसी भी तरह प्राणी का जीवन बचाया जाय । मनुष्य के संदर्भ में यह घटना और भी महत्वपूर्ण होती है । यदि मनुष्य में वृक्क की कार्य प्रणाली अवरूद्ध हो जाती है तो मनुष्य को या तो डायलिसिस पर रखा जाए या गुर्दे का प्रत्यारोपण किया जाए । एक समान जुड़वा बच्चों में आपस में अंग प्रत्यारोपण में कोई समस्या नहीं है । लेकिन आनुवंशिक दृष्टि से भिन्न मनुष्य का कोई अंग किसी दूसरे व्यक्ति में प्रत्यारोपित किया जाए तो अंग

प्रतिकार की संभावना अधिक रहती हे क्योंकि दाता तथा ग्राही दोनो के एंटीजन एक समान नहीं होते हैं । आनुवांशिक विभिन्नता के कारण सही दाता का मिल पाना बहुत कठिन है । इस परिस्थिति में स्वयं रोगी की कोशिका को लेकर इसे केन्द्रक विहीन अण्डे के साथ संगलित कर दिया जाता है । इस अण्डे को मंद विद्युत प्रवाह के द्वारा प्रेरित किया जाता है ताकि विदलन के समान विभाजन प्रारंभ हो जाए । जब विभाजन द्वारा ब्लास्टोसिस्ट के समान रचना बन जाती है तो इसमें से वृक्क का निर्माण करने वाली कोशिका को पृथक कर दिया जाता है । इसके संवर्धन से निर्मित अंग का रोगी में प्रत्यारोपण कर दिया जाता है । इस प्रकार स्तम्भ कोशिका से अंगो का निर्माण चिकित्सीय क्लोनिंग कहलाती है ।

10.7 निम्नताप परिक्षण

निम्न ताप परिरक्षण वह परिघटना है जिसमें कोशिका या ऊतक संवर्धन को शून्य उपापचय या अविभाजित अवस्था में लाया जाता है। व्यापक रूप से निम्न ताप परिरक्षण का अर्थ है जनक द्रव्य का न्यून तापक्रम पर संग्रह करना। सामान्यतया इस हेतु तरल नाइट्रोजन (-196°C) में कोशिका निष्क्रिय अवस्था में रहती है अतः इसे लंबे समय तक परिरक्षित किया जा सकता है।

10.8 निम्न ताप परिरक्षण की तकनीक

यह विधि उपस्थित जल को तरल अवस्था से ठोस अवस्था में रूपान्तरण से सम्बन्धित है कोशिका में लवण व कार्बनिक अणु उपस्थित होने के कारण कोशिकीय जल को फ्रीज करने के लिये लगभग -68°C ताप की आवश्यकता होती है । इस निम्न ताप पर उपापचयी प्रक्रियाएँ एवं जैविक परिघटनाएं लगभग शांत हो जाती निम्न ताप परिरक्षण को निम्न पदों में संपादित किया जाता है ।

1. निर्जर्मीकृत ऊतक संवर्धन का विकास

किसी पादप सामग्री का चयन करते समय विभिन्न कारको को ध्यान में रखना आवश्यक है । इनमें मुख्य रूप से कोशिका की प्रकृति एवं घनत्व महत्वपूर्ण है । इस हेतु नवजात विभज्योतक अधिक कोशिकाद्रव्य युक्त व रिक्तिका विहीन छोटी कोशिकाएं अधिक उपयुक्त होती है । पात्र में कोशिका का घनत्व अधिक होना चाहिए क्योंकि घनत्व ज्यादा होने पर कोशिका की उत्तरजीविता बढ़ जाती है ।

किसी पात्र में -196°C पर पादप सामग्री की उत्तरजीविता इसकी आकारिकी एवं कार्यिकी लक्षणों पर निर्भर करती है । प्रायः निम्न ताप परिरक्षण हेतु शीर्ष विभज्योतक, अण्डप, पुंकेसर, भ्रूण, व प्रोटोप्लास्ट का उपयोग किया जाता है ।

2. शीत परिरक्षक का मिलाना -

प्रायः यह देखा गया है कि फ्रीजिंग के समय कोशिका में बर्फ के क्रिस्टल बन जाते है जिससे कोशिकीय अंगक तथा कोशिका क्षतिग्रस्त हो जाती है। साथ ही कोशिका में विलेय की सांद्रता विषाक्त स्तर तक बढ जाती है,। शीत परिरक्षक वे रसायन है जिससे परिरक्षण के समय कोशिकीय क्षति में कमी आ जाती है। इस हेतु मुख्य रूप से शर्करा, ग्लाइकोल, शर्करा एल्कोहल

PEG (Polyethylene glycol,) PEO (Polyethylene oxide), डेंक्स्ट्रान, हाइड्रोक्सीस्टार्च, ग्लीसरीन, सुक्रोज तथा कुछ अमीनों अम्लों को उपयोग में ले सकते हैं।

सामान्यतया (Dmso (Dimethyl sulphoxide), सुक्रोज, ग्लीसरोल तथा प्रोटीन को शीत परिरक्षक के रूप में उपयोग में लिया जाता है। Dmso वर्तमान में सर्वाधिक उपयुक्त परिरक्षक है क्योंकि (1) इसका अणुभार कम होता है। (2) यह विलायक के साथ आसानी से मिश्रित हो सकता है (3) निम्न सांद्रता पर यह विषाक्त होता है। (4) यह कोशिका में आसानी से प्रवेश कर सकता है।

- 3. जमाना :- जमाने की प्रक्रिया इस प्रकार होनी चाहिये कि कोशिका में क्रिस्टल का निर्माण न हो इससे बचने के लिये नियंत्रित शीतलन का उपयोग किया जाता है पादप कोशिका के प्रकार के आधार पर जमाव विधियां (Freezing method) निम्न प्रकार की हो सकती है।
- (1) मंद जमाव विधि इस विधि में 0.5-5°C / min की दर से 0°C से 100°C/min तक धीरे धीरे जमाव किया जाता है व बन्द मे तरल नाइट्रोजन में इसको स्थानान्तरित कर दिया जाता है । इस विधि में जल की कुछ मात्रा कोशिका से बाहर प्रवाहित हो जाती है । इस कारण बर्फ के क्रिस्टल कोशिका के अंदर बनने की बजाय बाहर बन जाते है जिससे कोशिका आंशिक रूप से निर्जर्मीकृत हो जाती है । इस विधि का उपयोग निलंबित संवर्धन के शीत परिरक्षण में किया जाता है।
- (2) तीव्र जमाव विधि इस विधि में पादप सामग्री को बोतल में रखकर इसे तरल नाइट्रोजन में रखते है जिससे -300°C से 1000°C/min की दर से कम हो जाता है । जमाव की प्रक्रिया इतनी तीव्र होती है कि कोशिका में छोटे-छोटे क्रिस्टल बन जाते है । इस विधि का उपयोग तने के शीर्ष भाग व कायिक भ्रूण(Somatic embryo) के परिरक्षण में किया जाता है ।

(3) क्रमिक जमाव विधि -

यह विधि मंद एवं तीव्र जमाव विधि का मिश्रित रूप है जिसे क्रमिक रूप से संपादित किया जाता है। सर्व प्रथम पादप सामग्री को मध्यम ताप पर ठण्डा किया जाता है व लगभग 30 मिनट तक इसे नियत बनाये रखा जाता है। बाद में इसे तरल नाइट्रोजन मे रखकर तीव्रता से ठण्डा किया खोता है। इस विधि का उपयोग निलंबन संवर्धन तने के शीर्ष तथा कलिकाओं के परिरक्षण में किया जाता है।

(4) शुष्क जमाव विधि

कुछ वैज्ञानिकों ने पाया कि बिना अंकुरित शुष्क बीज निम्न ताप पर लंबे समय तक बने रह सकते हैं । जबिक जल के अवशोषण से अंकुरित बीज क्रायोजेनिक क्षति के प्रति अधिक सुग्राही होते हैं । इसी प्रकार शुल्क कोशिकाओं की उत्तरजीविता की दर शीत परिरक्षण के पश्चात् बढ़ जाती है ।

(5) संग्रहण

सामान्यतया जमाव कोशिकाएं तथा ऊतक को -70°C से -196°C के मध्य रखा जाता है । यद्यपि -130°C तापमान के पश्चात कोशिका में क्रिस्टल बनने प्रारंभ हो जाते है जिससे कोशिका की जीवंतता कम हो जाती है । संग्रह प्रक्रिया सामान्यतया वाष्प प्रावस्था में 150°C पर

एवं तरल प्रावस्था में -196°C पर की जाती है। संग्रह प्रक्रिया का मुख्य उद्देश्य समस्त उपापचयी क्रियाओं को रोक देना तथा इनकी जीवंतता को बनाये रखना होता है। लंबे समय तक संग्रह के लिये तरल नाइट्रोजन में - 196°C सर्वाधिक उपयुक्त होता है।

(6) पिघलाना

पिघलाने की प्रक्रिया में बोतल (Vial) को गर्म पानी (37-45°c) ताप पर तीव्रता से घुमाया जाता है । पिघलने के पश्चात बोतल को 20-25°c ताप पर Water bath में स्थानान्तरित किया जाता है । यह स्थानान्तरण इसलिये आवश्यक है क्योंकि 37-45°c तापमान पर लंबे समय तक रखने से कोशिका क्षतिग्रस्त हो जाती है ।

(7) पुन:संवर्धन

प्रायः पिघले हु ये जनन द्रव्य को अनेक बार जल से धोया जाता है तािक शीत परिरक्षक (Cryoprotectant) को हटाया जा सके । इस सामग्री को बाद में शुद्ध माध्यम में पुनः संवर्धित किया जाता है । कुछ वैज्ञानिक पिघले हु ये पदार्थ को बिना धोये हु ये प्रत्यक्षत संवर्धन करते है । क्योंकि जमाव के समय कुछ महत्वपूर्ण पदार्थ निर्मुक्त होते है जो पात्र में संवर्धन को प्रेरित करते है ।

(8) जीवनक्षमता का निर्धारण

जमाव कोशिकाओं की ऊतरजीविता का आकलन शीत परिरक्षण की किसी भी अवस्था में कर सकते है । इसका निर्धारण निम्न सूत्र के दवारा भी कर सकते है ।

 $= \frac{No.ofcells / organgrowing}{No.ofcells / organthawed}$

(9) पादप पुनरुद्भवन

शीत परिरक्षण का मुख्य उद्देश्य जनन द्रव्य से वांछित पादप के पुनरूद्भवन से है। इसकी वृद्धि के लिये कुछ वृद्धि कारकों का भी उपयोग किया जा सकता है।शीत परिरक्षण में सफलतापूर्वक उपयोग में लिये गये पादपों को तालिका सं. 2 में वर्णित किया गया है।

चित्र 10.5 स्तम्भ शीर्ष DMSO के साथ माध्यम पर वृद्धि स्तम्भ शीर्ष संवर्धन अर्द्ध ठोस माध्यम में संवर्धन माध्यम स्तम्भ शीर्ष में शीत परि-रक्षण (DMSO) द्रवित नाइट्रोजन में 25 C माध्यम में स्तम्भ शीर्ष प्रांकुर स्तम्भ शीर्ष प्रांकुर OOD गरम पानी में एम्पूल स्तम्भ शीर्ष तरल नाइट्रोजन में संग्रह की 🗲 तरल नाइट्रोजन में स्तम्भ शीर्ष वाई एम्पल सहित एम्पूल

तालिका सं. 2 शीत परिरक्षण में सफलतापूर्वक उपयोग में लिये गये पादप

पादप पदार्थ	पादप जाति
(कोशिका निलंबन)	ओराइजा सटाइवा
	ग्लाइसिन मैक्स
	जिआमेज
	निकोटिआना टोबेकम
	केपसिकम एनम
कैलस	ओराइजा सटाइवा
	केपसिकम एनम
	सेकेरम स्पी.
प्रोटोप्लास्ट	जिआमेज
	निकोटिआना टोबेकम
मेरिस्टम	सोलेनम ट्यूबरसम
	सिसर अरिंटीनम
जाइगोटिक भ्रूण	जिआमेज
	होरडम वलगेर
	मेनिहोट एस्कुलेंटा
कायिक भ्रूण	सिट्स साइनेंसिस
	डेकस करोटा
पोलन भ्रूण	निकोटिआना टोबेकम
	एट्रोपा बेलेडोना
	साइट्स स्पी.

10.9 सारांश:

प्राणियों में प्रजनन प्रक्रिया अलैंगिक तथा लैंगिक प्रकार की होती है। जिससे ये अपने अनुवांशिक गुणों को बनाये रखते हैं। मानव की जनसंख्या में निरंतर वृद्धि के कारण इनकी अन्य प्राणियों पर निर्भरता बढ़ती जा रही है। लेकिन यदि वर्तमान में प्राणियों की प्राकृतिक प्रजनन दर कम होने के कारण जैव तकनीकों की सहायता से इस समस्या का समाधान किया जा सकता है इन युक्तियों में वीर्य का संग्रह, शीत परिरक्षण, शुक्राणु योग्यतार्जन भ्रूण स्थानान्तरण, पात्र निषेचन, भ्रूणीय क्लोनिंग, ट्रांसजेनिक प्राणियों का निर्माण तथा भ्रूणीय स्तम्भ कोशिका का उपयोग किया जाता है। स्तनधारी प्राणियों में भ्रूण स्थानान्तरण, भ्रूण की प्राप्ति, जीन क्लोनिंग, भ्रूणीय क्लोनिंग विधियों का उपयोग किया जाता है। जिसका स्पष्ट उदाहरण डॉली भेड़ का निर्माण था वर्तमान में वैज्ञानिक इस दिशा में प्रयासरत है मानव आने वाले दिनों में अपनी स्वयं की काँपी क्लोनिंग द्वारा तैयार कर लेगा।

10.10 शब्दावली:

निषेचन - नर तथा मादा युग्मकों के प्रोकेन्द्रक का संलयन

आरोपण (Implantation) - ब्लास्टोसिष्ट का गर्भाश्य की भित्ति के साथ आलंबन

वीर्य बैंक - अस्पताल या वह संस्थान जहां पर वीर्य को निम्न ताप पर परिरक्षण विधि द्वारा संरक्षित किया जाता है।

डॉली - क्लोनिंग द्वारा निर्मित विश्व की पहली भेड़

शीतपरिरक्षण - वह विधि जिसमें निम्न ताप पर कोशिका अंगों का परिरक्षण किया जाता है । क्लोनिंग- जीनी रुप से समान या समान जीन संरचना वाले प्राणियों का निर्माण क्लोंनिग कहलाता है ।

क्लोन- ऐसे प्राणी, ऊतक, अंग या कोशिका जिनकी जीन संरचना समान हो एक दूसरे के क्लोन कहलाते है ।

उतरजीवितता- किसी कोशिका या ऊतक के जीवित रहने की क्षमता हो उतरजीवितता कहलाते है।

10.11 संदर्भ ग्रंथ :

डवलपमेन्टल बायोलोजी : स्कॉट एफ. गिलबर्ट

डवलपमेन्टल बायोलोजी : वॉलपर्ट

डवलपमेन्टल बायोलोजी : सॉन्डर्स

10.12 बोध प्रश्न :

- 1. क्लोनिंग दवारा निर्मित विश्व की प्रथम है।
- 2. अस्पताल में वह केन्द्र जहाँ पर वीर्य को संरक्षित किया जाता है..... कहलाता है ।
- 3. निम्न ताप पर कोशिका अंगों को परिरक्षित...... विधि द्वारा किया जाता है ।

10.13 अभ्यासार्थ प्रश्न :

- 1. भ्रूणीय क्लोनिंग से आप क्या समझते हैं? प्राणियों के केन्द्रक प्रत्यारोपण पर विस्तार से लिखिए ।
- 2. भ्रूणीय स्तंभ कोशिका की क्लोनिंग पर एक निबंध लिखिये।
- 3. उपयुक्त चित्रों की सहायता से प्राणियों में भ्रूण स्थानान्तरण का विस्तार से वर्णन कीजिये।
- 4. निम्न पर लघु टिप्पणियाँ लिखिये।
 - (a) पात्र निषेचन
 - (b) डॉली
 - (c) भ्रूण स्थानान्तरण
 - (d) स्तंभ कोशिका
 - (e) केन्द्रक प्रत्यारोपण

क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण । मानव तथा जंतुओं में अंत : पात्र निषेचन । क्लोनिंग सम्बन्धित नैतिक मुद्दे एवं खतरे।

NUCLEAR TRANSFER FOR CLONING. IN VITRO FERTILIZATION IN ANIMAL AND HUMAN. ETHICAL ISSUES AND RISK ASSOCIATED WITH CLONING.

इकाई की रूपरेखा

- 11.0 उद्देश्य
- 11.1 प्रस्तावना
- 11.2 क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण
- 11.3 मानव तथा प्राणियों मे अंतः पात्र निषेचन
 - 11.3.1 ऊसाइट का संग्रह
 - 11.3.2 श्क्राण्ओं का संग्रह
 - 11.3.3 पात्र निषेचन
 - 11.3.4 भ्रूण स्थानान्तरण
- 11.4 क्लोनिंग सम्बन्धी नैतिक मुद्दे एवं खतरे
- 11.5 सारांश
- 11.6 शब्दावली
- 11.7 सन्दर्भ ग्रन्थ
- 11.8 बोध प्रश्न
- 11.9 अभ्यासार्थ प्रश्न

11.0 उद्देश्य:

इस इकाई में आनुवांशिक रुप से एक समान संतित के उत्पादन तथा द्रांसजैनिक तकनीक. प्राणियों में आनुवांशिक रुपांतरण करने हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण का उपयोग तथा अंत:पात्र निषेचन तकनीक द्वारा परखनली शिशु का उत्पादन के बारे में विवेचना की गई है। साथ ही क्लोनिंग संबंधित नैतिक मुद्दों एवं खतरों के बारे में बताया गया है।

11.1 प्रस्तावनाः

आनुवांशिक रूप से एक समान संतित के उत्पादन तथा ट्रासजेनिक प्राणियों में आनुवंशिक रूपान्तरण करने हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण का उपयोग किया जाता है । कायिक कोशिका क्लोनिंग से डॉली का जन्म आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी में एक महत्वपूर्ण सूत्रपात था तथा केन्द्रक स्थानान्तरण तकनीक के लिये एक नींव के पत्थर के रूप में साबित हुआ । इस प्रगित में व्यापक स्तर पर क्लोनिंग तथा प्राणियों में आनुवांशिक रूपान्तरण हेतु एक कार्य प्रणाली विकसित हुई ।बहुत पहले ही माना जा चुका है किभ्रूण में उपस्थित समस्त केन्द्रक आनुवांशिक रूप से एक समान होते हैं एवं प्रत्येक केन्द्रक को केन्द्रक विहीन ऊसाइट में प्रत्यारोपित कर सकते है।

11.2 क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरणः

वर्तमान में क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण विधि का उपयोग किया जाता है। इस विधि में कोरकखण्ड कोशिका (Blastomere), भ्रूणीय कोशिका (Foetal cell), या वयस्क कोशिका (Adult cell) के केन्द्रक को केन्द्रक विहीन मध्यावस्था- II (Metapnase-II) के उसाइट में स्थानान्तरित किया जाता है। इस उसाइट में नये भ्रूण को निर्मित करने की क्षमता होती है जिसे ग्राही (Recipient) में स्थानान्तरण हेतु सर्वार्धित किया जाता है। इस दशक के प्रारंभ में कोरक खण्डों (Blastomere) को दाता केन्द्रक के रूप में प्रयोग में लिया जाता है क्योंकि यह माना जाता है कि ये कोशिकाएं अविभेदित रिप्रोग्रामिंग हेतु तत्पर एवं परिवर्धित होने की क्षमता रखती है। केन्द्रक स्थानान्तरण हेतु निम्न शर्तों का होना आवश्यक है।

- (1) भ्रूण के निर्माण हेतु उपयुक्त रूपांतरण ।
- (2) केन्द्रक तथा कोशिका द्रव्य (cytoplasm) के कोशिका चक मे क्रियात्मक अनुरूपता (Compatibility) होनी चाहिये ।
- (3) स्थानान्तरित केन्द्रक की पुन: रिप्रोग्रामिंग होनी चाहिए ।

केन्द्रक स्थानान्तरण तकनीकी का प्राणियों के उत्पादन में व्यापक उपयोग किया जाता है इस विधि में आनुवंशिक रूप से एक समान संतितयों का उत्पादन किया जाता है । एक समान आनुवंशिक लक्षणों वाले प्राणियों का उपयोग द्रुतगामी आनुवांशिक सुधार हेतु किया जाता है । यह विधि भैसों (Buffaloes) में अधिक कारगर सिद्ध हुई है जिसमें जननद्रव्य का तीव्र गुणन (multiplication) किया जा सकता है । इसकी सहायता से जीन की अंतः क्रिया (Interaction) को समझने तथा अलग-अलग मातृक (maternal) वातावरण में जीन की अभिव्यक्ति को समझने में सहायता मिलती है । इस विधि द्वारा ट्रासजेनिक प्राणियों का उत्पादन एवं इनका गुणन किया जा सकता है । तकनीकि मे सुधार के कारण प्राणियों के अलग-अलग ब्रीड की कोशिका शृंखला (cell- Line) को भी निर्मित किया गया है । इससे अवांछित आनुवांशिक विविधताओं को हटा कर प्राणियों में सुधार किया जा सकता है ।

केन्द्रक स्थानान्तरण में ऊसाइट का संग्रह इनका परिपक्वन, विकेन्द्रीकरण (enucleation), पृथक्करण (Seperation), दाता कोशिका(Blastomere, foetal call,

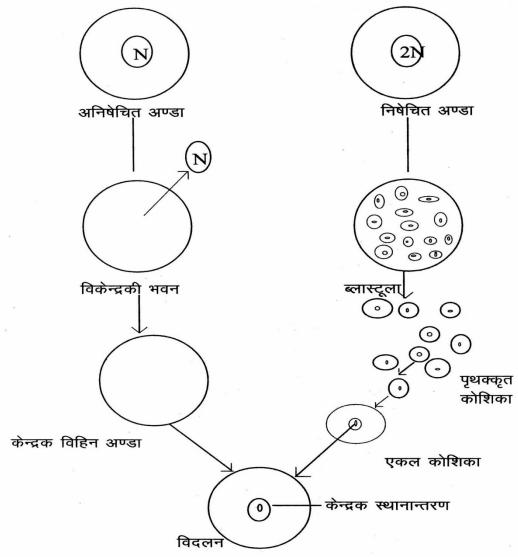
Adult cell) का स्थानान्तरण, दाता कोशिका का ग्राही ऊसाइट के साथ संगलन, रूपांतरित ऊसाइट का सिक्रयण एवं संवर्धन किया जाता है । ऊसाइट का संग्रह स्थानीय ब्र्चड़खानो (Abattoirs) से प्राप्त अण्डाशय (ovary) से किया जाता है तथा पात्र में (In vitro) अलग-अलग पोषक माध्यम की उपस्थिति में इनको सक्रिय किया जाता है । इस संवर्धन माध्यम में परिपक्व हो रहे ऊसाइट को साइटोकेल्सीन-B दवारा उपचारित किया जाता है जिससे कोशिका झिल्ली प्रत्यास्थ हो जाती है व इसे विकेन्द्रित (enucleate) कर दिया जाता है । ग्राही ऊसाइट के गुणसूत्रों को मध्यावस्था II (Metaphase -II) जोना पेल्यूसिडा से माइक्रोपिपेट प्रवेश कराकर इसकी हवा निकाली (Aspirate) जाती है । माइक्रोपिपेट के चारों ओर कोशिका झिल्ली अन्तर्वलित (Invaginate) हो जाती है व गुणसूत्रों का चूषण (suction) कर लिया जाता है। केन्द्रक के स्थानान्तरण हेतु ऊसाइट का संपूर्ण रूप से विकेन्द्रीकरण (enucleation) आवश्यक है । वर्तमान में गुणसूत्रों को अभिरंजित करने के लिये विशेष DNA-dyes का उपयोग किया जाता है जिससे गुणसूत्रों की दृश्यता (Visuality) व इनको हटाने की किया आसान हो जाती है । दाता कोशिका का पृथक्करण व स्थानान्तरण एक दक्ष कार्य है । जोना पेल्यूसिडा को हटाने से कोरक (Blastomere) खण्ड पृथक हो जाते है । इन भ्रूणीय कोरकखण्डों को Ca^{+2} तथा Mg^{+2} मुक्त माध्यम में रखा जाता है जिससे कोशिकाएं शिथिल (Relax) हो जाती हैं इनके पृथक्करण के लिये ट्रिप्सीन का उपयोग किया जाता है । एकल कोरक खण्डो (Blastomere) को माइक्रोपिपेट की सहायता से aspirate किया जाता है । तृतक (Morula) व ब्लास्टोसिस्ट अवस्था तक के कोरकखण्ड (Blastomere) पूर्णशक्त (Totipotent) होती हैं । यह भी पाया गया है कि बोवाइन आंतरिक कोशिका पिण्ड (Inner cell mass) के केन्द्रक भी बहु शक्त होते है ।

दाता केन्द्रक तथा ग्राही ऊसाइट का संगलन स्पंदन क्षेत्र में कोशिका के कोण (Angle), इनका संपर्क एवं दाता कोशिका के आकार पर निर्भर करता है । केन्द्रक प्रत्यारोपण विधि में ऊसाइट का सिक्रियण अत्यधिक जिटल कार्य है । इस प्रक्रिया में Ca^{+2} के स्तर में वृद्धि MPF (Maturation promoting factor) का अवमंदन एवं 6 -डाई मेथिल एमिनोप्यूरिन के उपयोग से ऊसाइट का परिवर्धन ब्लास्टोसिस्ट अवस्था तक होता है जो IVF (In vitro fertilization) ऊसाइट के समान होता है ।

दाता कोशिका तथा ग्राही ऊसाइट के मध्य कोशिकीय अतुल्यकालिता (Asynchrony) भी ग्राही ऊसाइट के परिवर्धन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है ।यह पाया गया है कि जब केन्द्रक का प्रत्यारोपण, मध्यावस्था- II (Metaphase - II) के ऊसाइट में किया जाता है तो केन्द्रक झिल्ली विघटित हो जाती है तथा गुणसूत्र संघनित हो जाते है । इसके पश्चात् केन्द्रक झिल्ली पुनः निर्मित होती है । केन्द्रक में उत्फुलन (Swelling) आती है । सबसे उपयुक्त स्थानान्तरण में दाता तथा ग्राही दोनों मध्यावस्था- II (Metaphase II) में होने चाहिए । यह भी पाया गया है कि G_2 अवस्था में भी कोशिका अच्छे दाता का कार्य करती है । (Rabbit) खरहे में पाया गया है कि जब दाता कोरक खण्ड G_2 या S प्रावस्था में हो तो ब्लास्टोसिस्ट प्रावस्था तक परिवर्द्धन तीव्रता से होता है प्रायः तुतक (morula) अथवा ब्लास्टोसिस्ट (Blastocyst) अवस्था के भ्रूण

को ग्राही मादा में स्थानान्तरित किया जाता है । इस स्थानान्तरण की सफलता की दर चोंपाये जानवरों में 11 प्रतिशत तथा भेड़ों में 10 प्रतिशत से भी कम होती है । भ्रूण के केन्द्रक स्थानान्तरण के पश्चात् गर्भधारण (Pregnancy) की दर बहुत कम होती है ।

केन्द्रक स्थानान्तरण के विभिन्न प्रयोगों में पाया गया है कि असामान्य जीनोम होने पर भी भ्र्ण का परिवर्धन ब्लास्टोसिस्ट अवस्था तक हो जाता है । यद्यपि इसमें गर्भधारण की दर बहुत कम होती है ।इस विधि द्वारा प्राप्त संतित में बडा आकार, भ्र्णीय अवस्था में मृत्यु तथा अनुकूलन (Adaptation) की क्षमता जैसे लक्षण पाये जाते है । कई बार इन प्राणियों में परिवर्धन सम्बंधी समस्याएं जैसे असामान्य भ्र्ण का निर्माण भी देखने को मिलती है । लेकिन इस बात का निर्धारण अभी नहीं हो पाया है कि ये लक्षण केन्द्रक स्थानान्तरण के कारण है अथवा भ्र्ण के संवर्धन माध्यम में रखने के कारण है ।



चित्र 11.1 क्लोनिंग हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण तकनीक

11.3 मानव तथा प्राणियों में अंतः पात्र निषेचनः

जब संवर्धन माध्यम में शुक्राणु तथा अण्डाणु का निषेचन कराया जाता है तो इसे अंत पात्र निषेचन (In Vitro fertilization) कहते हैं । इस विधि में स्वस्थ मादा तथा नर से क्रमशः अण्डाणु (Ovum) तथा (Sperm,) शुक्राणु को प्राप्त करके उपयुक्त माध्यम में इनका निषेचन किया जाता है । निषेचन से उत्पन्न युग्मक (zygote) का संवर्धन माध्यम में परिवर्धन कराया जाता है तथा अंत में ग्राही मादा के गर्भाशय में इसका प्रत्यारोपण किया जाता है । जब संवर्धन माध्यम में उत्पन्न भ्रूण या किसी दाता मादा (Donor female) के गर्भाशय में उत्पन्न भ्रूण का किसी चयनित मादा के गर्भाशय में स्थानान्तरण, भ्रूण प्रत्यारोपण कहलाता है । अंतः पात्र निषेचन की क्रिया चार पदों में सम्पन्न होती है ।

- 11.3.1 उसाइट का संग्रह उसाइट के संग्रह के लिये स्त्री में अण्डाशय सामान्य हो लेकिन फैलोपियन निलका अवरूद्ध हो गई हो या क्रियात्मक अण्डाशय उपस्थित होने पर उसाइट का संग्रह दाता मादा (donor female) से किया जाता है। लेकिन इसके लिये स्त्रियों में होने वाले रज चक्र को नियमित किया जाता है। इस हेत् निम्न युक्तियाँ काम मे ली जाती है।
- (1) प्राकृतिक रूप से अण्डलयन के समय को ज्ञात करने के लिये रक्त या मूत्र में LH के स्तर को प्रेक्षित किया जाता है। जिस दिन LH का स्तर अधिक हो उस दिन ऊसाइट प्राप्ति की संभावना अधिक रहती है।
- (2) स्त्रियों में क्लोमिफेन तथा HMG (Human menopausal gonadotrophin) को प्रवेश कराकर अण्डलयन की क्रिया को प्रेरित किये जा सकते है ।
- (3) HCG (Human chorionic gonadotrophin) के उपयोग द्वारा फोलिकल के परिवर्धन को अवरूद्ध किया जा सकता है जिससे अण्डाणु निर्मुक्त नहीं है । इन ऊसाइट को उपयुक्त समय पर लेप्रोस्कोप द्वारा एकत्रित कर लिया जाता है । लेकिन इस विधि में HCG का प्रवेश उचित समय पर होना चाहिए ।

यदि क्लोमिफेन का लगातार उपयोग किया जाये तो उपचारित मादा में गर्भपात होने की संभावना अधिक रहती है । जबिक HMG द्वारा किया गया उपचार अधिक महंगा साबित होता है । अतः वर्तमान में क्लोमीफेन तथा HMG दोनों का संयुक्त रूप से उपयोग किया जाता है । HCG के उपयोग एवं लेप्रोस्कोप द्वारा ऊसाइट की प्राप्ति सर्वाधिक सुविधाजनक होती है ।

- 11.3.2 शुक्राणुओं का संग्रह -निषेचन के 60-90 मिनट पहले वीर्य को संग्रहित किया जाता है । इसको तरलीकृत करके अपकेन्द्रित किया जाता है । शुक्राणु के अवसादन को संवर्धन माध्यम में डाला जाता है एवं 37°C पर 30-60 मिनट तक सेचन (incubate) किया जाता है । निषेचन हेतु शुक्राणु के अवसादन की सतह से शुक्राणु को लिया जाता है क्योंकि शुकाणु सर्वाधिक सिक्रय सतह पर ही उपस्थित होते है । वीर्य की प्राप्ति ओलिगोस्पर्मिया या एजोस्पर्मिया के व्यक्तियों से नहीं करनी चाहिए ।
- 11.3.3 पात्र निषेचन (In Vitro fertilization)- पुट्कीय तरल में उपस्थित ऊसाइट की पहचान सूक्ष्मदर्शी द्वारा की जाती है। इन ऊसाइट को परिपक्व काल तक हैम F- 10 माध्यम (Ham

F-10 medium), अर्ल विलयन (Earl solution) तथा कीटन माध्यम (Whitten medium) में रखा जाता है।

निषेचन हेतु शुक्राणु युक्त तरल की 100 से 1 एमआइ मात्रा ऊसाइट के ऊपर डाली जाती है । 12 से 13 घण्टे पश्चात निम्न लक्षणों की पहचान हेतु ऊसाइट को प्रेक्षित किया जाता है ।

- (अ) प्राक-केन्द्रकों एवं ध्रुवीय काय की संख्या
- (ब) ऊसाइट में कणियकरण
- (स) ऊसाइट की आकृति

एक निषेचित युग्मनज मे. दो प्राक-केन्द्रक एवं दो ध्रुवीय काय उपस्थित होते हैं । 24-30 घंटे पश्चात 'विदलन किया प्रारंभ हो जाती है । यदि कोई युग्मनज 30 घण्टे पश्चात भी विभाजित नहीं होता है तो इसको आरोपण हेत् उपयोग में नहीं लेना चाहिए ।

11.3.4 भूण स्थानान्तरण- प्राकृतिक अवस्था में फैलोपियन निलका में युग्मनज का परिवर्धन 8-16 कोशिकाओं तक होता है। इसके पश्चात् भ्रूण प्रवास करके गर्भाशय मे चला जाता है। जहाँ यह गर्भाशय की भिति के साथ आरोपित हो जाता है। पात्र निषेचित भ्रूण की 16 कोशिकीय प्रावस्था को सफलता पूर्वक गर्भाशय में प्रत्यारोपित किया जाता है। लैंगिक 2-4 कोशिकीय प्रावस्था आरोपण हेत् अधिक उपयुक्त होती है।

गर्भाशय में भ्रूण का स्थानान्तरण टेफलोन केथेटर की सहायता से किया जा सकता है। कुछ मात्रा संवर्धन तरल की भी गर्भाशय में स्थानान्तरित करते है। भ्रूण स्थानान्तरण की क्रिया को अत्यधिक सावधानी से किया जाना चाहिए। भ्रूण आरोपण हेतु यह भी आवश्यक है कि मादा रज चक्र की उपयुक्त अवस्था में होनी चाहिए। यदि बच्चे की चाह रखने वाली स्त्री के गर्भाशय में विकार हो तो ऐसी परिस्थिति में किराये की कोख (Surrogate mother) का उपयोग किया जाता है।

इस विधि द्वारा उत्पन्न संतान परखनली शिशु कहलाती है । सर्व प्रथम 25 जुलाई 1978 को लुईस ब्राउन नामक प्रथम परखनली शिशु का जन्म हुआ था ।

भूण स्थनान्तरण तकनीकी के उपयोग - इस तकनीकी द्वारा प्राणियों के गुणन की दर में वृद्धि की जा सकती है । सामान्य अवस्था में एक मादा द्वारा एक वर्ष में केवल एक ही संतित का उत्पादन हो सकता है । लेकिन अतिअण्डता एवं भ्रूण स्थानान्तरण विधि द्वारा एक ही मादा से 36 भ्रूण प्राप्त किये जा सकते है । एक मादा को एक बार में 6 बार अण्डलयन हेतु प्रेरित किया जा सकता है । प्रत्येक अण्डलयन में 6 स्वस्थ भ्रूण प्राप्त हो सकते है।

- प्रत्येक भ्रूण को 2-4 अंशों में विपाटित करके प्रत्येक टुकड़े को संतित उत्पादन हेतु उपयोग में
 लिया जा सकता है । क्योंकि प्रत्येक खण्ड में पूर्णशक्तता (Totipotency) पाई जाती है ।
- नवजात भ्रूण को तरल नाइट्रोजन में 10 वर्षी तक शीतिलत कर सुरक्षित रखा जा सकता है ।
 नवजात भ्रूण का तरल नाइट्रोजन में पिरक्षिण शीत पिरक्षिण (cryopreservation)
 कहलाता है । सबसे पहले भ्रूण को ग्लीसरोल से उपचारित किया जाता है । इनको 38°C पर

धीरे-धीरे ठण्डा किया जाता है ।इसके बाद भ्रूण को तरल -नाइट्रोजन में रखकर -196°C पर परिरक्षित किया जाता है ।

सीमाएं

भ्रूण स्थानान्तरण तकनीकी में निम्न सीमाएं है जो इस प्रकार है-

- (1) स्पष्ट संक्रिया के लिये दक्ष विशेषज्ञ की आवश्यकता होती है।
- (2) भ्रूण स्थानान्तरण तकनीकी सामान्य प्रक्रिया की तुलना में अत्यधिक महंगी है
- (3) दाता मादा को नवजात भ्रूण के दाता के रूप में उपयोग में लेने तक उत्पादन से दूर रखा जाता है।

11.4 क्लोनिंग सम्बन्धित नैतिक मुद्दे एवं खतरे:

जैव तकनीकी में सुधार व उन्नित तथा इसकी विभिन्न क्षेत्रों मे उपयोगिता का संबंध सदैव विवादों से घिरा रहा है इसी आधार पर मानव समुदाय को तीन श्रेणियों में रखा गया है।

- (1) प्रबल विरोधी यह समुदाय नवीन तकनीकी का सदैव विरोध करता है । इनका मानना है कि जैव प्रौद्योगिक पूर्ण रूप से अप्राकृतिक परिघटना है ।
- (2) प्रबल समर्थक यह समुदाय नवीन तकनीकी का सदैव पक्षधर रहा है ।इनका मानना है कि जैव प्रौधोगिकी पूर्ण रूप से मानव समाज के हित के लिये है ।
- (3) उदासीन समुदाय- यह समुदाय संतुलित अवधारणा है । इनका मानना है कि जैव तकनीकी से होने वाले फायदे तथा नुकसान विज्ञान की अन्य शाखाओं से होने वाले फायदे तथा नुकसान से ज्यादा भिन्न नहीं है।

जैव प्रौद्योगिकी के पीछे इतना शोर एवं ऋणात्मक मानसिकता क्यों है । यह इसलिए है क्योंकि आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी की अधिकांश शाखाएं जीन के रूपान्तरण से संबंधित है । ये अप्राकृतिक आनुवंशिक रूपान्तरण अप्रत्याशित परिणामों के लिए उत्तरदायी हो सकते है । जैव प्रौद्योगिकी के नैतिक वैधानिक व सामाजिक मुद्दे- ELSI (Ethical, Legal and social implications of Biotechnology) जैव प्रौद्योगिकी के व्यापक रूप से जैव प्रौद्योगिकी एवं समाज के पारस्परिक सम्बंधों से सम्बंधित है । वर्तमान में विकासशील देशों में इस तकनीकी के होने वाले संभावित धनात्मक एवं ऋणात्मक प्रभाव निम्न तालिका में वर्णित है । विकासशील देशों में जैव प्रौधोगिकी के धनात्मक व ऋणात्मक प्रभाव

धनात्मक प्रभाव

- " स्वास्थ्य और जीवन अवधि में स्धार
- " फसल उत्पादन में वृद्धि
- " भोजन के आयात पर कम निर्भरता
- " ऊर्जा उत्पान हेतु जैव भार में वृद्धि
- " पौधों तथा प्राणियों का बायो रियेक्टर में उपयोग
- भोजन संग्रह की सुविधाओं में सुधार
- " चौपाये जानवरों के स्वास्थ्य एवं उत्पादन में वृद्धि

ऋणात्मक प्रभाव

" विकसित देशों पर निर्भरता

- " नई तकनीकी तथा प्राकृतिक संसाधनों पर दूसरे देशों पर निर्भरता
- " बेरोजगारी में वृद्धि
- " प्राकृतिक जैव विविधता एवं परितंत्र में दास
- कानून की पेचीदिगयों में वृद्धि
- " हर्बी साईड प्रतिरोधी पादपों का निर्माण एवं उन पर निर्भरता

आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी मुख्य रूप से विषाणु, जीवाणु, पादप प्राणी, मछली, तथा पिक्षियों के आनुवांशिक रूपातंरण से संबंधित हैं विभिन्न सजीवों में बाहरी जीन के प्रवेश से सुरक्षा नैतिकता तथा अवांछित परिणाम के खतरे सामने होते है। प्रायः समाचार पत्रों में इस परिघटना को. निम्न शीर्षकों से प्रचारित किया जाता रहा है।

- अ- जीवन से छेड़छाड़
- ब- प्रकृति से खिलवाड़
- स- मानव निर्मित उदविकास

यह संभावना व्यक्त की जा रही है कि आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा खतरनाक बन सकते है । जिनसे महामारी व पर्यावरणीय प्रलय उत्पन्न हो सकती है । इसके लिये कुछ दिशा निर्देश जरूरी है ।

वर्तमान में यह भी माना जाता है कि जैव प्रौद्योगिकी मानव समुदाय के लिये लाभदायक है लेकिन साथ में इस बात का ध्यान रखा जाना आवश्यक है कि मानव समुदाय, पर्यावरण एवं अवांछित सामाजिक नैतिक समस्याएं निम्न संदर्भ में उत्पन्न न हो ।

- अ- स्वास्थ्य रक्षण हेत् प्रयोग में होने वाले उत्पाद
- ब- खाद्य एवं खाद्य सामग्री में आन्वंशिक रूपान्तरण
- स- पर्यावरण में GEM (Genetically Engineered Microrganism) की निर्मुक्ति
- द- मानव आनुवांशिक शोध के अनुप्रयोग

डॉली भेड़ की क्लोनिंग के पश्चात् कुछ शोधकर्ताओं ने मानव की क्लोनिंग मे रूचि दिखाई लेकिन इससे संबंधित शोध कार्यो पर प्रतिबंध लगा दिया । हाल ही में ब्रिटेन में 2005 मे केन्द्रक स्थानान्तरण विधि द्वारा मानव क्लोन की प्रारंभिक भ्रूणीय अवस्थाओं को विकसित करने में सहायता मिली है । यद्यपि वैज्ञानिक भी क्लोनिंग द्वारा नवजात बेबी के निर्माण के पक्ष में नहीं है लेकिन ये टेस्ट ट्यूब बेबी के निर्माण के समर्थन में है । जिनसे स्तम्भ कोशिकाएं प्राप्त की जा सकती है । वह दिन दूर नहीं जब इस विधि द्वारा क्षतिग्रस्त ऊतकों की मरम्मत की जा सकेगी एवं पार्किन्सन रोग (Parkinson's disease) एवं मधुमेह (Diabetes melitus) जैसे रोगों का उपचार संभव हो सकेगा ।

जैव प्रौद्योगिकी एवं विकासशील देश

जैव प्रौद्योगिकी से सम्बंधित अधिकांश शोध कार्य विकसित देशों में हुये है लेकिन विकासशील देशों को इससे होने वाले फायदे निम्न है-

- 1- ट्रांसजैनिक पादपों व प्राणियों के निर्माण के कारण पोषण (nutrition) के स्तर में सुधार होगा
- 2- पुर्नयोजी वैक्सीन के कारण बच्चों की मृत्युदर में कमी आयेगी।
- 3- उपयुक्त उपचार के कारण पीने का शुद्ध पानी उपलब्ध होगा ।

4- सीवेज उपचार में सफलता मिलेगी।

मानव स्वास्थ्य के क्षेत्र में इस प्रौद्योगिकी के उपयोग के कारण आने वाला समय ऐसा होगा कि किसी राष्ट्र की प्रगति का बेरोमीटर जैव प्रौद्योगिकी के उपयोग से लगाया जायेगा।

11.5 सारांश:

अनुवांशिकी रूप से एक समान संतित के उत्पादन तथा ट्रांसजैनिक प्राणियों में रूपान्तरण करने हेतु केन्द्रक स्थानान्तरण विधि का उपयोग किया जाता है। वर्तमान में क्लोनिंग हेतु कोरकखण्ड कोशिका, भ्रूणीय कोशिका या वयस्क कोशिका के केन्द्रक को ऊसाइट में स्थानांतिरत किया जाता है। इस ऊसाइट में नये भ्रूण को निर्मित करने की क्षमता होती है। इस सम्पूर्ण प्रक्रिया में ऊसाइट का संग्रह, शुक्राणुओं का संग्रह, भ्रूण स्थानान्तरण पात्र निषेचन आदि पदों को सम्पादित किया जाता है। यद्यिप भ्रूण स्थानान्तरण में अनेक किनाईयों का सामना करना पड़ता है। तथा इसकी सफलता की दर बहुत कम है इस तकनीक के साथसाथ मानव समुदाय के सामने अनेक नैतिक मुद्दे एवं खतरे सामने आ रहे हैं। कुछ वैज्ञानिक इसके प्रबल विरोधी हैं कुछ प्रबल समर्थक हैं तथा कुछ उदासीन समुदाय के हैं। विभिन्न सामाजिक कार्यकर्ता इस तकनीक को जीवन से छेड़छाड़, ईश्वर से खिलवाड़ तथा मानव निर्मित उद्विकास के रूप में प्रचारित कर रहे हैं। यद्यिप इन प्रयोगों को निति निर्धारित कर सम्पादित किया जाये तो इसके सुखद परिणाम आने वाली पीढ़ी को देखने को मिलेंगे।

11.6 शब्दावली

ट्रासजैनिक प्राणी (Transgenic Animal)- वे प्राणी जिसमें किसी दूसरी जाति अथवा सदस्य का जीन स्थानान्तरित कर दिया हो जैसे केले में इन्सुलिन हार्मीन को उत्पन्न करने वाले जीन का समावेशन

कोरकखण्ड (Blsatomere)- युग्मनज में विदलन द्वारा निर्मित कोशिकाएं । तुतक (Morula) प्राणी के परिवर्धन के दौरान निर्मित ठोस प्रावस्था । कोरक (Blastula)- प्राणी के परिवर्धन के दौरान निर्मित खोखली प्रावस्था । ब्लास्टोसिस्ट (Blastocyst)- स्तनधारियों में गर्भाशय की भित्ति से जुड़ने वाली भ्रूणीय अवस्था । पात्र निषेचन (In Vitro fertilization)- प्राणी के बाहर संवर्धन माध्यम में अण्डे का निषेचन ।

11.7 संदर्भ ग्रंथ :

- डवलपमेन्टल बायोलोजी : स्कॉट एफ. गिलबर्ट
- डवलपमेन्टल बायोलोजी. वॉलपर्ट
- डवलपमेन्टल बायोलोजी. सॉन्डर्स

11.8 बोध प्रश्न:

- 1. वे प्राणी जिनमें किसी दूसरी जाति अथवा सदस्य का जीन स्थानांतरित कर दिया जाता है तो
- 2. अंत : पात्र निषेचन में प्राणी का संवर्धन शरीर से जाता है1

11.9 अभ्यासार्थ प्रश्नः

- 1- क्लोनिंग से आप क्या समझते है?
- 2- अंतःपात्र निषेचन पर एक लघु टिप्पणी लिखो ।
- 3- क्लोनिंग सम्बंधी नैतिक मुद्दों एवं खतरों का विवेचना कीजिए।
- 4- भ्रूण स्थानान्तरण प्रौधोगिकी पर निबंध लिखिये।
- 5- निम्न पर लघु टिप्पणियां लिखो ।
 - अ- अंतः पात्र निषेचन
 - ब- भ्रूण स्थानान्तरण
 - स- क्लोनिंग संबंधी नैतिक मुद्दे एवं खतरे
 - द- क्लोनिंग के धनात्मक एवं ऋणात्मक प्रभाव
 - क- भ्रूण स्थानान्तरण तकनीकी के उपयोग

पराजीनी प्राणी । प्राणियों में पराजीनी तकनीक । माइक्रोइन्जेक्शन तकनीकी, रिट्रोवायरल वाहक विधि । पराजीनी प्राणी की उपादेयता ।

TRANSGENIC ANIMA. TRANSGENIC METHODS IN ANIMALS. MICROINJECTION TECHNIQUES, RETROVIRAL VECTOR METHOD. APPLICATION OF TRANSGENIC ANIMALS.

इकाई की रुपरेखा

- 12.0 उद्देश्य
- 12.1 प्रस्तावना
- 12.1 जन्तुओं में ट्रान्सजेनिक विधियां
 - 12.2.1 कैल्सियम फॉस्फेट अवक्षेपण
 - 12.2.2 डीईएई- डेक्स्ट्रेन (DEAE Dextran) द्वारा ट्रांसफेक्शन
 - 12.2.3 लाइपोफेक्शन
 - 12.2.4 इलेक्ट्रोपोरेशन
 - 12.2.5 रिट्रोवाइरस संक्रमण
 - 12.2.6 सूक्ष्म इन्जेक्शन
 - 12.2.7 भ्रूणीय स्तंभ कोशिका तकनीक
- 12.3 ट्रांसजेनिक जंतुओं की उपयोगिताएं
- 12.4 सारांश
- 12.5 शब्दावली.
- 12.6 संदर्भ ग्रंथ
- 12.7 बोध प्रश्न
- 12.8 अभ्यासार्थ प्रश्न

12.0 उद्देश्य:

ट्रांसजेनिक जन्तुओं के निर्माण के कारण वांछित गुणों से युक्त दूध, ऊन एवं मांस जैसे लाभदायक उत्पाद के साथ इन मिश्रित आनुवांशिक संगठन वाले जन्तुओं से विभिन्न घातक रोगों के निदान के संबंध में बहु मूल्य ज्ञान प्राप्त किया जा रहा है (जैसे एल्जाईमर रोग, रेटिनों किरेटोब्लास्टोमा इत्यादि) । इसके अतिरिक्त विभिन्न प्रकार की औषधी एवं टीके भी इन जन्तुओं से प्राप्त किये जा रहे हैं (गामा इन्टरफेरोन, इन्टरल्युकिन पदार्थ इत्यादि) । ये जन्तु वास्तव में

लाभदायक पदार्थों को उत्पत्र करने वाले एक संश्लेषी तंत्र के रूप में कार्य करने लगते हैं । इसलिये इन्हें बायो रिएक्टर भी कहा जाता है ।

12.1 प्रस्तावना :

सर्वप्रथम (ट्रांसजेनिक) शब्द का उपयोग गॉर्डन एवं रडल (Gordan and Ruddle) द्वारा 1983 में किया गया । 1980 में गॉर्डन ने पूर्व केन्द्रकीय सूक्ष्म अंतःक्षेपण (Pronuclear microinjection) विधि द्वारा ट्रांसजीनी चूहे का निर्माण किया । इस प्रकार के सफल प्रयोग के द्वारा स्तनी परिवर्धन के दौरान जीन्स के प्रभावों को समझने में बहुत सहायता मिली । इसके अतिरिक्त ट्रांसजेनिक तकनीक की सहायता से रोगों को नियन्त्रित करने वाले अनुवांशिक प्रक्रियाओं का अध्ययन एवं इन प्रक्रियाओं को कृत्रिम रूप से नियंत्रित करने में सहायता मिल सकती है । ट्रांसजेनिक तकनीक के कारण अब पालतु जन्तु जैसे गाय, भेड़, बकरी, मुर्गी, खरहा, मछली इत्यादि को इच्छित तौर पर चाही गयी लक्षणों से युक्त कर उत्पत्र किया जा सकता है तथा इनमें से कुछ प्रयोग सफल भी हुए हैं ।

जब जन्तु की कोशिकाओं अथवा भ्रूण में किसी बाहय डी.एन.ए. खण्ड या अणु, वाहक अणु (Vector) के साथ संलग्न कर प्रवेश कराया जाता है तो इसे परासंक्रमण (Transfection) कहा जाता है जन्तु के डी.एन.ए. अणु (जीनोम) में इस वाहक युक्त बाहय डी.एन.ए. खण्ड को ट्रांसजीन कहा जाता है, जो तत्पश्चात् अपने वाहक से पृथक होकर जीनोम के डी.एन.ए. में समाकित हो जाता है, अन्ततः इस बाहय डी.एन.ए. पर स्थित जीन जन्तु के जीनोम के मूल डी.एन.ए. के साथ मिलकर अपने विशिष्ट गुणों को कोडित प्रोटीन के रूप में प्रकट करते हैं । जब यह बाहय, स्थानान्तरित डी.एन.ए. (ट्रान्स डी.एन.ए. खण्ड) कोशिका में अल्प समय के लिए रहता है तो इसे अस्थाई ट्रांसफेक्शन कहा जाता है । किन्तु जब पारजीन ट्रांसफेक्शन कहा जाता है ।

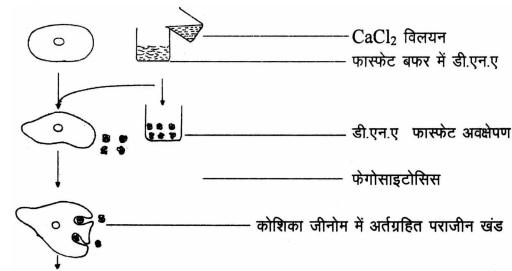
किसी जन्तु में बाहय जीन्स के प्रवेश कराने की तकनीक के फलस्वरूप नये प्रकार के आनुवांशिक संगठन वाले जीवों का उद्भव होता है। इनके निर्माण से निम्नलिखित उद्देश्यों की पूर्ति हो सकती है-

- 1. इच्छित बाहय डी.एन.ए. के किसी अन्य जन्तु में स्थानान्तरण तथा तत्पश्चात् ट्रांसजीन द्वारा कोडित इच्छित प्रोटीन को सरलता से प्राप्त किया जा सकता है।
- 2. जन्तुओं में उनके निर्धारित गुणों में वृद्धि करने हेतु आनुवांशिक रूपान्तरण किया जाता है जैसे ट्रांसजेनिक मवेशियों एवं भेड़ों से सामान्य से अधिक मात्रा में दुग्ध, मांस को प्राप्त करने के लिये इन पराजीनी जन्तुओं को निर्माण किया जाता है।
- 3. ट्रांसजेनिक जन्तुओं में इच्छित जीन के प्रकटीकरण के कारण उस जीन विशेष की कार्यप्रणाली को बेहतर ढंग से समझा जा सकता है, इस कारण आनुवांशिक रोगों के उत्तरदायी जीन्स के ट्रांसजेनिक जन्तुओं में अतिरिक्त प्रतिरूप बनवाकर इन रोगों के निदान हेतु ज्ञान अर्जित किया जा सकता है तथा तत्पश्चात् रोग उत्पत्र करने वाले विकृत जीन के स्वस्थ प्रतिरूप को पीड़ित जन्तु में प्रवेश कराकर रोग का निदान किया जा सकता है।

4. जब एक बार इस प्रकार इच्छित लक्षण को नियमित करने वाले जीन का ज्ञान हो जाता है तो उसे धारण करने वाले ट्रांसजेनिक जन्तुओं के संतित उत्पन्न की जाती हैं जिनसे बड़े पैमाने पर कोई लाभदायी प्रोटीन प्राप्त कर विशिष्ट प्रायोगिक एवं चिकित्सा महत्व के प्रक्रियाओं की पूर्ति होती है।

12.2 जन्तुओं में ट्रासजैनिक विधियां:

12.2.1 कैल्सियम फॉस्फेट अवक्षेपण- इस विधि में इच्छित डी.एन.ए. खण्ड को सर्वप्रथम फॉस्फेट बफर में घोला जाता है एवं उसमें कैल्सियम क्लोराइड विलयन मिलाया जाता है । इससे अघुलनशील कैल्सियम फॉस्फेट का निर्माण होता है जो कि डी.एन.ए. के साथ अवक्षेपित होता है । अब डी.एन.ए.- अवक्षेप को ट्रान्सफेक्ट किए जाने वाले कोशिकाओं के साथ मिलाया जाता है । अवक्षेपित कणों को कोशिकाएँ भक्षण किया के द्वारा अंत्ग्रहित कर लेती हैं । यह विधि लगभग सभी स्तनी कोशिकाओं पर लागू है ट्रांसफेक्टेड कोशिकाओं में डी.एन.ए. जीनोम में समाकितत हो जाता हैं ।



चित्र 12.1 कैल्सियम फास्फेट अवक्षेपण विधि द्वारा ट्रांसफेक्शन

12.2.2 डीइएइ डेक्स्ट्रेन द्वारा ट्रान्सफेक्शन (DEAE Dextran Mediated Transfection)डाईमिथाइल एमीनोइथाइल (Dimethylaminoethly - dextran) डेक्स्ट्रेन जल में घुलनशील
तथा अनेक धनात्मक आवेश युक्त यौगिक होता है । इसे स्थानान्तरित किए जाने वाले
(Transfection)- डी.एन.ए. खण्ड युक्त विलयन में मिलाया जाता है । डीइएइ डेक्स्ट्रेन निर्धारक
पोषक (Host) -कोशिकाओं के ट्रान्सजीन (DNA खण्ड) को एण्डोसाइटोसिस (अन्तग्रहण) द्वारा
ग्रहण करने हेतु प्रेरित करता है । वैज्ञानिकों के अनुसार ऋणात्मक आवेशित डी.एन.ए. तथा
कोशिका झिल्ली के सतही संरचनात्मक अणुओं दोनो के साथ अभिक्रिया कर डीइएइ डेक्स्ट्रेन उन्हें
सिक्रिय बनाता है।

यह विधि स्थाई ट्रान्सफेक्शन हेतु लाभदायक नहीं मानी जाती है किंतु अस्थाई ट्रान्सफेक्शन (Transient transfection) के लिए उपयोगी सिद्ध हुआ है जिनका प्रयोग आणविक जैविकी में अस्थाई ट्रान्सफेक्शन का ही उपयोग किया जाता है।

12.2.3 लाइपोफेक्शन (Lipofection) - लाइपोसोम्स द्वारा किसी इच्छित बाह्य डी.एन.ए. खण्ड (Transgene) का धारक कोशिका में प्रवेश को ही लाइपोफेक्शन (Lipofection) अथवा अन्य शब्दों में इसे लाइपोसोम्स द्वारा ट्रान्सफेक्शन कहा जाता है । सामान्यतः धनात्मक आवेशयुक्त लाइपोसोम कणों का उपयोग किया जाता है क्योंकि ऋणात्मक आवेश डी.एन.ए. सरलता से इन कणों से बंधित हो जाता है । इससे इन डी.एन.ए. लाइपोसोम कॉम्पलेक्स कणों के ट्रान्सफेक्शन (Transfection) से पूर्व बाह्य पुष्टि के निर्माण करने की आवश्यकता नहीं होती जैसा अनावेशित लिपिड दवारा निर्मित लाइपोसोम्स के साथ होता है ।

धनात्मक आवेशित लाइपोसोम्स एक वसीय द्विस्तरीय झिल्ली द्वारा बने होते हैं जिसके कारण ये कण सरलता से साथ कोशिकाओं से बंधित हो जाते है तथा संभवतः कोशिका झिल्ली से समायोजन के बाद बाह्य डी.एन.ए. को कोशिका में निर्मुक्त कर देते है ।यांत्रिकीय तौर से लाइपोसोम्स का निर्माण जल में फॉस्फेटाइल कोलीन जैसे किसी फॉस्फोलिपिड को विसरित कर (Disperse) किया जाता है । इसमें एक किलोबेस डी.एन.ए. तक के खण्ड सरलता से समायोजित हो सकते है ।

एक किलोबेस से अधिक आकार के डी.एन.ए. खण्डो के समायोजन हेतू Trans -DNA खण्ड को लाइपोसोम्स में आस्तरित करवाया जाता है ।इसके डी.एन.ए. को Ca^{2+} के साथ ऋणात्मक आवेशित फॉस्फेटाइडिल सीरीन (Phosphatidylserine) विलयन में प्रवेश कराया जाता है । तत्पश्चात् इस नव निर्मित कॉम्प्लेक्स को टू-फेज तकनीक के द्वारा Transfection हेत् उपयुक्त बनाया जाता है ।

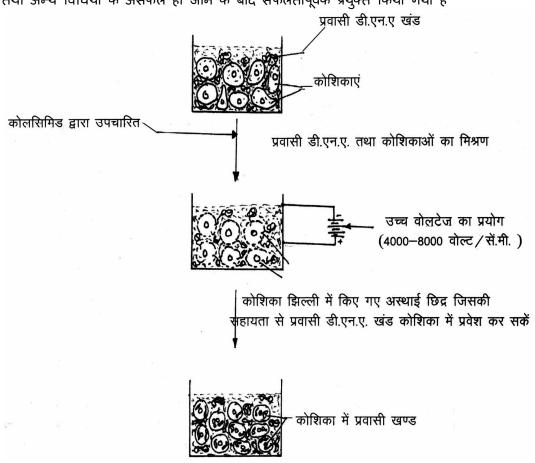
धारक कोशिकाएं डी.एन.ए. युक्त लाइपोसोम्स को भक्षण प्रक्रिया द्वारा अर्न्तग्रहित करते हैं । भक्षाणु कायों का कोशिका का लाइपोसोम्स के साथ समायोजन होता है जिससे बाहा डी.एन.ए. का लाइपोसोम्स के साथ ही विघटन कर दिया जाता है । इस कारण अल्प मात्रा में ही Trans-DNA खण्ड समायोजित होते हैं ।काइमेरिक जन्तुओं में कुछ कोशिकाओं का ही स्थायी रूप से Transfection होता है जबिक अन्य कोशिकाएं केवल अस्थाई रूप से ट्रान्सफेक्ट होती हैं ।वास्तव में रीट्रो वाइरस के आर.एन.ए. जीनोम के प्रतिरूप बनाने हेतु विशेष रिवर्स ट्रांसिक्किप्टेज (Reverse Transcriptase) पाया जाता है, जो अपने निर्देशन में डी.एन.ए. प्रतिरूप को बनाता है, जिसका अन्ततः पोषक धारक डी.एन.ए. के साथ समायोजित हो जाता है, किन्तु इस विधि की सीमाएं है । जैसे की इस प्रकार का रिवर्स ट्रान्सिक्रिप्टेज केवल 3- प्रावस्था (कोशिका विभाजन के समय संश्लेशी प्रावस्था) की कोशिकाओं में ही स्पष्ट होता है, अर्थात् जो सिक्रय समस्त्री विभाजन करने में सक्षम होते है।

12.2.4 इलेक्ट्रोपोरेशन (Electroporation)

इस विधि में धारक कोशिकाओं एवं ट्रांस-DNA खण्डों को मिलाकर एक मिश्रण तैयार किया जाता है एवं तत्पश्चात् इसे 4000-8000 वोल्ट / सेमी. की दर से कुछ मिलि सेकण्डों तक ही वैद्युतीय आवेश के द्वारा उद्दीप्त किया जाता है जिससे कोशिका झिल्ली में अनेक अस्थाई छिद्र उत्पन्न हो जाते हैं जिनके माध्यम से डी.एन.ए. खण्ड कोशिका में प्रवेश करने में सक्षम होते हैं।

इलेक्ट्रोपोरेशन से पहले धारक कोशिकाओं को कॉल्सेमिड (Colcemid) से उपचारित करने पर डी.एन.ए. ट्रांसफेक्सन में काफी वृद्धि होती है । संभवतः कॉल्सेमिड कोशिकाओं के विभाजन को मेटाफेज प्रावस्था में ही रोक देती है तथा इस प्रावस्था के दौरान केन्द्रकीय आवरण की अनुपस्थिति के कारण ट्रांस- डी.एन.ए.अणु के साथ समायोजित होने में अत्यधिक सरलता होती है । रेखीय डी.एन.ए. अणु द्वारा ट्रांसफेक्सन वृत्तीय डी.एन.ए. की तुलना में अधिक प्रभावी होता है ।

इलेक्ट्रोपोरेशन ट्रांसजीन खण्डों के समायोजन में काफी प्रभावशाली विधि मानी जाती है तथा अन्य विधियों के असफल हो जाने के बाद सफलतापूर्वक प्रयुक्त किया गया है



चित्र 12.1 - ट्रांसफेक्शन मिश्रण की सहायता से इलेक्ट्रोपोरेशन

12.2.5 रेद्रोवाइरस विधि (Retroviral Infection) - इस विधि के अन्तर्गत पुनर्योजी रीट्रोवायरस द्वारा निर्मित वाइरॉन कण जीनों के ट्रांसफेक्शन हेतु प्रयुक्त किये जाते हैं । प्राकृतिक तौर पर रीट्रोवायरस अपने पोषक कोशिका के संक्रमण के दौरान स्वयं के केन्द्रक रूपी जीनोमिक RNA अणु की सहायता से तथा स्वयं के अनुसार ही एक डी.एन.ए खण्ड का निर्माण करता है जो तत्पश्चात् कोशिका के जीनोम में समायोजित हो जाता है । तत्पश्चात इस तरह कोशिका जीनोम को नियन्त्रित करके अपने ही जीनोम वाले वाइरॉन कणों का निर्माण करता है जो तत्पश्चात् अन्य कोशिकाओं को संक्रमित करते हैं । वैज्ञानिक, विषाणु के इसी गुण का लाभ उठाकर धारक जन्तु

कोशिकाओं में ट्रांस डी.एन.ए. के विघटित होने का खतरा कम होता है । सामान्यतः चार कोशिका युक्त भ्रूण में ट्रांस डी.एन.ए का इस विधि द्वारा शत प्रतिशत रूपान्तरण संभव हो सकता है । क्योंकि चार कोशिका प्रावस्था के पश्चात् भ्रूण की सभी में से कुछ कोशिकाओं में ही इस तरह से रूपान्तरण संभव होता है, इससे मिश्रित द्विआनुवांशिक संगठन वाले जीवों अर्थात् मिश्रित जीनोटाइप युक्त जन्तु या फिर एक काइमेरिक जन्तु का निर्माण होता है । काइमेरिक जन्तुओं में कुछ कोशिकाओं का ही स्थायी रूप से ट्रांसफेक्शन होता है जबकि अन्य कोशिकायें केवल अस्थायी रूप से ट्रांसफेक्ट होती हैं ।

वास्तव में रीट्रोवायरस के आर.एन.ए. जीनोम के प्रतिरूप बनाने हेतु विशेष रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़ (Reverse Transcriptase) पाया जाता है जो अपने निर्देशन में डी.एन.ए. प्रतिरूप को बनाता है जिसका अन्ततः पोशक. धारक डी.एन.ए. के साथ समायोजित हो जाता है । किन्तु इस विधि की सीमायें हैं जैसे कि इस प्रकार का रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़ केवल S- प्रावस्था (कोशिका विभाजन के समय संश्लेषी प्रावस्था) की कोशिकाओं में ही स्पष्ट होता है अर्थात तो सिक्रय समसूत्री विभाजन करने में सक्षम होते हैं ।

12.2.6 माइक्रोइन्जेक्शन विधि (Microinjection Method)- इस विधि के अन्तर्गत ट्रांस-डी.एन.ए. मिश्रण का किसी कोशिका के केन्द्र में या फिर निशेचित हुए अण्डाणु में प्रविष्ट नर-प्रोन्यूक्लियस (नर पूर्व केन्द्रक) में इंजेक्शन द्वारा प्रवेश कराया जाता है, क्योंकि नर केन्द्रक मादा केन्द्रक से बड़ा होता है।

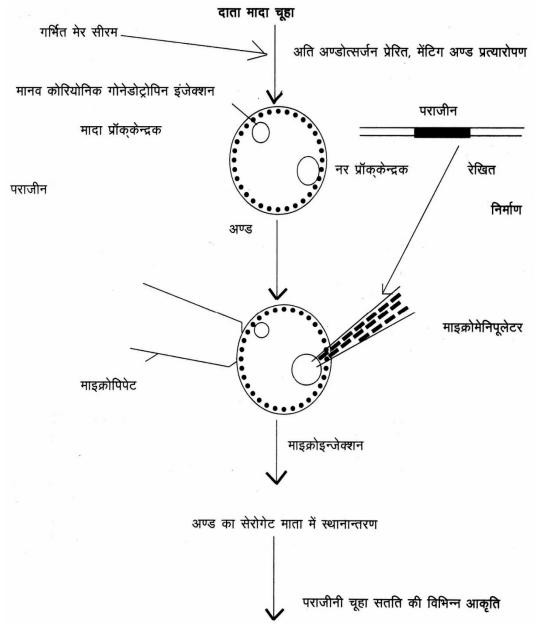
सर्वप्रथम एक मादा चूहे को गर्भधारित मादा घोड़े के सीरम एवं तत्पश्चात मानव (स्त्री) के कोरियोनिक गोनेडोट्रॉपिन का इन्जेक्शन दिया जाता है, जिससे मादा के उत्तेजित अण्डाशय लगभग 35 परिपक्व अण्डाण् उत्पन्न करती है।

इस सुपरओब्लेटेड मादा (अतिअण्डोत्सर्जन युक्त मादा) का परिपक्व नर चूहे के साथ प्रजनन कराया जाता है। तत्पश्चात् मादा के गर्भ से निषेचित अण्डों को एकत्रित कर संतुलित लवण विलयन में भण्डारित किया जाता है। सूक्ष्मदर्शी द्वारा नर पूर्वकेन्द्रक तथा मादा केन्द्रक युक्त अण्डाणु का चयन किया जाता है।तत्पश्चात् नर पूर्व केन्द्रक में ट्रान्स-जीन को माइक्रोपिपेट् द्वारा माइक्रोइन्जेक्ट किया जाता है। इसके बाद ट्रान्सजीन युक्त 25-40 अण्डाणुओं को किसी परिपक्व मादा चूहे के गर्भाशय में रोपित किया जाता है। तत्पश्चात् इस मादा को एक ऐसे नर के साथ प्रजनन कराया जाता है, जिसकी शुक्रवाहिका (Vas deferens) बाधित की गई है। इससे कूट गर्भ धारण (Pseudopregnancy) की स्थिति मादा में उत्पन्न होती है, जिससे निषेचित अण्डों के आगे की परिवर्धन प्रक्रिया संपन्न होती है। अंततः यह मादा ट्रान्सजीन शिशुओं को जन्म देती है। तत्पश्चात् इन ट्रान्सजेनिक चूहों का सदर्न ब्लॉटिंग (Southern Blotting) परिक्षण द्वारा जीनोटाइप में जीन्स का पता लगाया जाता है।

चूहों मे केवल 3-6 प्रतिशत चूहों में ट्रान्सजैनिक व्यवस्था स्थापित होती है तथा भेड़ एवं सूकर में तो यह परिवर्तन एक प्रतिशत से भी कम है । जर्म कोशिका में स्थापित हो जाने के कारण ट्रान्सजीन जनक से संतित में मेन्डेलियन आनुवांशिकी के नियमों के अनुसार स्थानान्तरित हो जाते है ।

ट्रांसजीन का समायोजन कोशिका जीनोम के किसी भी भाग के साथ हो सकता है तथा किसी एक कोशिका में या भ्रूण में यह समायोजन केवल एक ही गुणसूत्री भाग में संभव होता है।

माइक्रोइन्जेक्शन विधि के प्रयोग में काफी समय लग जाता है, क्योंकि प्रारंभ में केवल कुछ ही भ्रूणीय कोशिकाएं रूपांतरित हो पाती है । विशुद्ध ट्रांसजेनिक जन्तुओं को काइमेरिक जन्तुओं के मध्य अनेक बार उपयुक्त प्रजनन व्यवस्थाओं के पश्चात् ही प्राप्त किया जा सकता है।



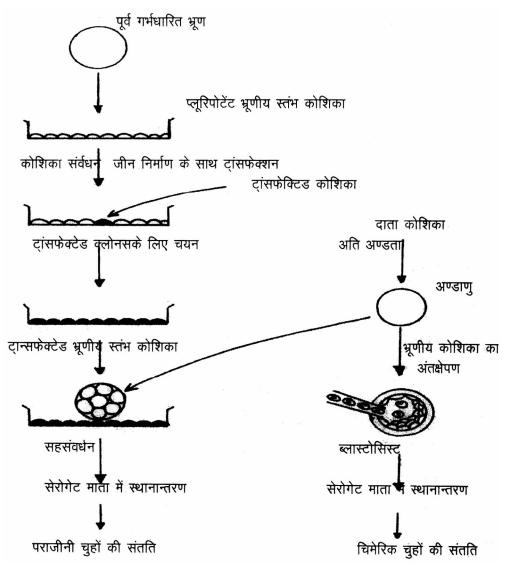
चित्र 12 .3 माइक्रोइन्जेक्शन विधि द्वारा इच्छित डी.एन.ए. खण्ड का प्रवेश
12.2.7 भूणीय स्तम्भ कोशिका टेक्मोलॉजी (Embryonic stem cell technology) - इस
प्रकार की व्यवस्था में जन्तु की स्तम्भ कोशिकाएं (Stem Cells) अनेक प्रकार की कोशिकाओं

को उत्पन्न करने की क्षमता रखते हैं । इन स्तम्भ कोशिकाओं को भ्रूण से रोपण के पूर्व प्राप्त किया जाता है एवं इन्हें संवर्धित किया जाता है । इन संवर्धित 'त कोशिकाओं में इच्छित डी.एन.ए. खण्ड ट्रांसजीन (Transgene) को उपयुक्त ट्रांसफेक्शन विधि द्वारा प्रवेश कराया जाता है । तत्पश्चात् इन स्तम्भ कोशिकाओं को पहचान कर उनका चयन किया जाता है एवं अन्ततः क्लोनिंग द्वारा संवर्धित किया जाता है ।

- 1. सर्वप्रथम मादा चूहे के गर्भ में परिवर्धित भ्रूण को ब्लास्टोसिस्ट अवस्था में ही एकत्रित किया जाता है।
- 2. स्तम्भ कोशिकाएं ब्लारटोसिस्ट के आंतरिक कोशिका समूह में पाए जाते है । इन स्तम्भ कोशिकाओं को इस संहित से पृथक कर एकित्रत किया जाता है एवं लक्षण के संतुलित विलयन में रखा जाता है ।
- 3. इच्छित ट्रान्सजीन को किसी चिंहित जीन जैसे नीयोमाइसिन प्रतिरोधक जीन के साथ संलग्न किया जाता है और इस मिश्रित ट्रांस-डी.एन.ए. खण्ड के दोनों सिरों से विशेष समरूपी पुनर्योजी न्यूक्लियोटाइड श्रृंखलाओं को जोड़ा जाता है ।
- 4. तत्पश्चात् स्तम्भ कोशिकाओं एवं ट्रांसजीन खण्डों को मिलाया जाता है । इस मिश्रण में कैल्सियम फॉस्फेट Ca ($PO_{4)3}$ मिलाया जाता है । स्तम्भ कोशिकाएं ट्रांस-डी.एन.ए. खण्डों को ट्रांसफेक्शन दवारा ग्रहण करते है ।
- 5. तत्पश्चात् इन स्तम्भ कोशिकाओं को नीयोमाइसिन युक्त लल्चर माध्यम से स्थानान्तरित कर दिया जाता है जिसमे नीओमायसिन प्रतिरोधी जीन युक्त कोशिकाएं ही संवर्धित हो सकती है एवं अन्य कोशिकाएं मृत हो जाती है । संवर्धित स्तम्भ कोशिकाओं के समूह को एकत्रित कर पुनः कृत्रिम रूप से संवर्धित किए जाते है । इन पुनर्योजी स्तम्भ कोशिकाओं को चूहे के अन्य ब्लास्टोसिस्ट भ्रूणों में पुनः माइक्रोइंजेक्शन द्वारा प्रवेश करा दिया जात है तथा इन स्तम्भ कोशिका युक्त नए ब्लास्टोसिस्ट भ्रूणों को एक पृथक परिपक्व मादा चूहे (प्रतिनिधि जनक) के गर्भ में रोपण द्वारा स्थापित किया जाता है । तत्पश्चात् बाधित शुक्रवाहिका युक्त नर चूहे के साथ प्रजनन कराए जाने के बाद परिपक्व मादा में कूट गर्भ धारण की स्थिति उत्पन्न हो जाती है । अन्ततः 21 दिनों के बाद यह मादा ट्रान्सजैनिक शिशुओं को जन्म देती है जिनकी पहचान सदर्न ब्लॉटिंग (Southern Blotting) द्वारा 'किया जाता है।

12.3 ट्रांसजेनिक जन्तुओं की उपयोगिताएं :

पराजीनी जन्तुओं को उत्पादन या निर्माण किसी विशेष उद्देश्य को प्राप्त करने के लिए किया गया है। यह उद्देश्य सामान्यतः व्यावसायिक हितों एवं वैज्ञानिक अध्ययन से जुड़े हुए है। पराजीनी जन्तु अनेक प्रजातियों के अंतर्गत बनाए गए है - इनमें चूहे, खरहा, भेड़, बकरी, गाय, मुर्गी, मछली, उभयचर, कीट एवं नीमेटोड प्रमुख है।



चित्र 12.4 भूणीय स्तंभ कोशिका स्थानान्तरण विधि

- (1) पराजीनी चूहा (Transgenic Rat) इनका निर्माण शोध कार्य हेतु किया गया है तथा इनमें रती- चक्र एवं गर्भ में शिशु के परिवर्धन चक्र का कम समय में ही पूर्ण हो जाना, एक साथ कई शिशुओं को जनने की क्षमता इन्हें विशेष रूप से पराजीनी विधि हेतु उपयुक्त बनती है।
- (2) पराजीनी खरहा (Transgenic Rabbit) इन्हें जीन फार्मिंग या आण्विक कृषि हेतु लाभदायक माना जा रहा है । इन ट्रान्सजीनी जन्तुओं से औषधीय महत्व के अनेक प्रोटीन्स (जिनका कोडोन Transgenes द्वारा किया गया) प्राप्त किए जाते है । इसलिए इन्हें बायोरिएक्टर (Bioreactors) भी कहा जाता है । मानव उपयोग हेतु interleukin-2 वृद्धि हार्मीन, उत्तकीय प्लास्मीनोजन उत्तेजक, एण्टीट्रिप्सिन प्राप्त किए जा रहे है ।
- (3) पराजीनी मवेशी (Transgenic Cattle) इन पराजीनी जन्तुओं को अधिक से अधिक दुग्ध तथा मांस उत्पादन हेतु निर्मित किया गया । दूसरा उपयोग मानव हित में कई मानव जीन्स

को गाय में माइक्रोइन्जेक्शन द्वारा प्रवेश कराया गया है तथा उनके द्वारा प्रोटीन्स को प्राप्त किया जा रहा है । इसके अतिरिक्त दुग्ध से केसीन प्रोटीन की उन्नत किस्म विषाणु एवं जीवाणु द्वारा उत्पन्न रोगों के प्रति बेहतर प्रतिरोधक क्षमता, मक्खन तथा लैक्टोज की मात्रा में वृद्धि इत्यादि अन्य प्रकार के लाभ भी प्रमुख है ।

- (4) पराजीनी भेड़ (Transgenic Sheep) पारजीनी भेड़ का निर्माण अधिक वृद्धि मांस उत्पादन तथा बायोरिएक्टर के रूप में उपयोग किया गया है । मानव के रक्त स्कंदन हेतु आवश्यक 18 कारक के जीन को सफलतापूर्वक भेड़ में प्रवेश कराया गया है । इसके मानव के वृद्धि हॉर्मोन के जीन को प्रवेश कराकर अधिक मांस उत्पादन एवं वृद्धि अर्जित की गई है । पारजीनी जन्तुओं का देह भार, मांस / वसा अनुपात में वृद्धि हुई है ।
- (5) पराजीनी सुअर (Transgenic Pigs) सुअर में पारजीनी जन्तुओं का उत्पादन भेड़, मवेशी एवं बकरियों की तुलना में काफी कम है । पारजीनी सुअर के निर्माण का उद्देश्य अधिक वृद्धि एवं अधिक मांस उत्पादन प्राप्त करना है ।
- (6) पराजीनी मछली (Transgenic Fish) पारजीनी मछिलयों में सामान्य कार्य, रेनबो ट्राउट, अटलांटिक साल्मॉन, कैटिफिश, गोल्डिफिश, मेडाका, तिलिपिया, जेबराफिश प्रमुख है । मुर्गी के S-Crystalline (क्रिस्टेलाइन) प्रोटीन, विन्टर-फलाउण्डर प्रतिफ्रीज प्रोटीन,ई कोलाई-β-गैलेक्टोसाइडेज

12.4 सारांश:

सभ्य मानव द्वारा प्रारम्भ से ही जन्तुओं को पालने की प्रथा एक प्रमुख कार्य के रूप में किया जाने लगा है। तत्पश्चात् यह एक प्रमुख व्यवसाय के रूप में उभर कर आया जिसके साथ कम से कम परिश्रम एवं लागत द्वारा अधिक से अधिक एवं इच्छित उत्पाद प्राप्त कर ने के लिये मानव सदा प्रयासरत रहा और भविष्य में भी रहेगा। इस उद्देश्य को पूरा करने के लिये वैज्ञानिक आधार पर इच्छित एवं लाभदायक गुणों से युक्त जन्तु प्रजातियों को चयन करके अनेक पीढ़ियों तक नियन्त्रित प्रजनन करवाकर उत्पादों में वांछित गुणों को प्राप्त करने का प्रयास किया गया है। इसमें विभिन्न किस्मों के मवेशी, भेड़, बकरी, मछली एवं पक्षी जैसे मुर्गी इत्यादि प्रमुख है। वर्तमान समय में चयनित प्रजनन की व्यवस्था अत्यन्त कारगर सिद्ध हुई है किन्तु इससे चयनित जन्तु प्रजातियों की एक प्रभावी आनुवांशिक श्रृंखला स्थापित हो जाती है जिसके पश्चात आवश्यकता पड़ने पर नये लक्षणों को चयनित प्रजनन विधि द्वारा इन स्थापित जन्तु श्रृंखलाओं में प्रवेश कराना बहुत मुश्किल होता है। किन्तु अब इस समस्या का स्त्मी कोशिकाओं में विभिन्न अन्य प्रजातियों के जीन का स्थानान्तरण करके एवं दैहिक कोशिकाओं के केन्द्रक को स्वकेन्द्रक रहित अण्डाण् में प्रवेश कराने की तकनीक द्वारा हल ढूंढ लिया गया है।

उक्त तकनीक द्वारा ऐसे जन्तुओं का विकास किया गया है जिनके आनुवांशिक जीनोम में कृत्रिम विधि द्वारा विजातीय डी.एन.ए. खण्डों को प्रविष्ट कराया गया है तत्पश्चात् इस बाहय डी.एन.ए. का स्थानान्तरण पराजेनिक जन्तु अपनी संततियों में कर देते हैं।

इस प्रकार मिश्रित जीनोम वाले जन्तुओं को ट्रांसजेनिक जन्तु कहा जाता है । वर्तमान समय में ट्रांसजेनिक जन्तुओं को तैयार करने के लिये जैविक वाहक (विषाणु एवं बैक्टीरिया) तथा रासायनिक विधियों की सहायता ली गयी है । इनमें रिट्रोवायरल संक्रमण विधि, कैल्सियम फॉस्फेट अवक्षेपण विधि, डीईएई-डेस्ट्रान विधि, लाइपोफेक्यान, इलेक्ट्रोपोरेशन, सूक्ष्म अन्तःक्षेपण विधि एवं भ्रोणीय स्टेम सेल तकनीक प्रमुख हैं ।

इन विधियों को दो प्रमुख भागों में बांटा जा सकता. है, पहली जैविक आधारीय विधि जिसमें बाहय डी.एन.ए. खण्डों को ग्राही कोशिका में प्रवेश कराने के लिये जैविक वाहक जैसे विषाणु एवं बैक्टीरिया का उपयोग किया जाता है । दूसरी ओर जीन स्थानान्तरण के लिये कृत्रिम रूप से निर्मित वाहक जैसे लाइपोसोम्स इत्यादि का उपयोग किया जाता है । इसके अन्तर्गत लाइपोफेक्शन इत्यादि विधि सम्मिलित है । प्रमुख ट्रासजेनिक जंतुओं में चूहे, मवेशी, सूअर, बकरी, मुर्गी जैसे पॉल्ट्री के पक्षी एवं मछलियां सम्मिलित हैं ।

12.5 शब्दावली:

- 1. **पराजीन (Transgene)-** किसी विशेष प्रजाति के जन्तु के जीनोम में कृत्रिम विधि द्वारा अन्य प्रजाति के DNA खण्ड को जब उपयुक्त वाहक द्वारा प्रवेश कराया जाता है तो इस बाहय DNA खण्ड को पराजीन या ट्रान्सजीन कहते हैं ।
- 2. परासंक्रमण (Transfection)- जब किसी विशेष प्रजाति के जन्तु अथवा उसके भ्रूण में किसी अन्य प्रजाति के DNA को प्रवेश कराया जाता है तो इसे परासंक्रमण कहते हैं।
- 3. **अस्थायी परासंक्रमण (Unstable Transfection)-** जब बाह्य स्थानान्तरित DNA (पराजीन) ग्राही कोशिका में प्रवेश के बाद अल्प समय के लिये ही रहता है एवं बाद में लुप्त हो जाता है तो इसे अस्थायी परासंक्रमण कहा जाता है ।
- 4. स्थायी परासंक्रमण (Stable Transfection) जब पराजीन ग्राही कोशिका द्वारा उत्पन्न सभी संतित कोशिकाओं में उपस्थित होता है तथा लुप्त नहीं होता है तो इसे स्थायी परासंक्रमण कहा जाता है।
- 5. पराजीनी जन्तु (Transgenic Animals)- ऐसे जन्तु जिनके जीनोम में प्रायोगिक विधियों (परासंक्रमण) द्वारा किसी भिन्न प्रजाति के परम को प्रविष्ट कराया. गया तथा जो इस बाहय DNA को अपने संततियों में स्थानांतिरत करने में सक्षम होते है उन्हें पराजीनी जन्तु जाता है।
- 6. **लाइपोफेक्शन** (**Lipofection)-** इस विधि में धनायनिक लाइपोसोम्स के साथ पराजीनिक DNA को संलग्न कर ग्राही कोशिका में कोशिका अर्न्तग्रहण (Endocytosis) द्वारा धारण किया जाता है।
- 7. **इलेक्ट्रोपोरेशन (Electroporation)-** कोशिका झिल्ली में विद्युतीय धारा के क्षणिक उद्दीपन से अस्थायी छिद्र उत्पन्न कराकर शुद्ध बाहय DNA के प्रवेश कराने की प्रक्रिया को इलेक्ट्रोपोरेशन कहते हैं।
- 8. **स्क्ष्म अन्तःक्षेपण विधि (Microinjection Method)** किसी बाह्य DNA खण्ड को किसी ग्राही कोशिका के केन्द्रक में या किसी निशेचित अण्डाणु में स्थित नर प्राक्केन्द्रक में अन्तःक्षेपण द्वारा प्रवेश कराने की विधि को सूक्ष्म अन्तःक्षेपण विधि कहा जाता है।

- 9. रिट्रोवायरस (Retrovirus)- ये RNA धारक विषाणु होते हैं जिनमें विशेष किण्वक रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज होता है जिसकी सहायता से ये जीव संक्रमण के समय पोषक कोशिकाओं में प्रवेश कर अपने RNA के निर्देशानुसार एक DNA अणु का निर्माण करते हैं जो तत्पश्चात् यूकेरियोटिक कोशिका के DNA में समायोजित हो जाता है।
- 10. **आदि पूर्वगामी कोशिका (Stem Cell)-** स्तम्भ कोशिका जो विभाजन द्वारा विकसित एवं विभेदित कोशिकाओं को उत्पन्न करने की क्षमता रखती हो उसे स्तम्भ कोशिका कहा जाता है।
- 11. **लाइपोसोम्स (Liposomes) -** झिल्ली द्वारा सम्बन्ध या आस्तरित सकेन्द्रीय कणिका जो जलीय माध्यम में उपस्थित वसा पदार्थ के चारों ओर बनते हैं उन्हे लाइपोसोम्स कहते हैं । वर्तमान समय में कृत्रिम रूप से लाइपोसोम्स का निर्माण किया जा रहा है जिसके द्वारा विभिन्न लाभदायक एवं इच्छित रासायनिक या औषधीय यौगिकों को विशिष्ट अंगों में पहुंचाया जा रहा है ।
- 12. **काइमेरिक डी एन ए (Chimeric DNA)** जब एक ही जीनोम एक DNA में एक से अधिक प्रकार के भिन्न DNA के भाग समायोजित हो जाते हैं तो इस प्रकार के डी. एन. ए. को काइमेरिक डी. एन. ए. कहा जाता है । ट्रांसजेनिक जन्तु भी सामान्यतः काइमेरिक या मिश्रित DNA युक्त जीव होते हैं ।
- 13. अति अण्डोत्सर्जन (Super Ovulation) जब जन्तु का अण्डाशय सामान्य से अधिक मात्रा में अण्डाणुओं को संश्लेषण करता है तो इस असामान्य कार्यिकीय प्रक्रिया को अति अण्डोत्सर्जन कहा जाता है।
- 14. जैविक रिएक्टर (Bio Reactor)- जब ट्रांसजेनिक जन्तु के देह से बड़े पैमाने पर इच्छित प्रोटीन या कोई अन्य लाभदायक पदार्थ को प्राप्त किया जाता है तो ऐसे जन्तु को जैविक रिएक्टर कहा जाता है । इसमें जन्तु का देह एक संश्लेषी तंत्र के रूप में कार्य करता है ।

12.6 संदर्भ ग्रंथ:

- 1. Mitra, S. (1996) "Genetic Engineering- Principles. "Macmillan India Ltd. Delhi.
- 2. Primrose, S.B and Twyman, R.M. (2006). "Principles of Gene Manipulation and Genomics." (7th ed...) Blackwell Publishing, USA.
- 3. Freshney, R.I (ed.) (1992)."Animal cell culture: A Practical Approach (2nd ed.)". Oxford University Press, Oxford.
- 4. Paul, J. (1975). "Cell and Tissue Culture (5th ed.)" Livingstone, Edinburgh. U.K.
- 5. Bulock, J.D. and Kristiansen, B. (eds.) 1987. "Basic Biotechnology". Academic Press, New York.

- Meyers, R.A. (ed.) 1995. "Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference". VCH Publishers, (U.K.) Ltd., Cambridge
- 7. Winnacker, E.L. (1986). "From Genes to Clones- Introduction to Gene Technology". Panima Publishing Corporation, New Delhi.
- 8. Glick, B.R. and Pasternak, J.J. (2003)." Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA (3rd ed.)" ASM Press, Washington, D.C.

12.7 बोध प्रश्न:

- 1. ट्रांसजेनिक जन्तुओं के निर्माण की आवश्यकता क्यों पड़ती हैं
- 2. स्टेम कोशिका तकनीक को ट्रांसजेनिक जन्तुओं के निर्माण में महत्वपूर्ण क्यों माना जाता है?
- 3. पराजेनिक जन्तुओं को बायो रिएक्टर क्यों कहा जाता है?
- 4. ट्रांसजेनिक डी.एन.ए. को काइमेरिक डी.एन.ए. क्यों कहा जाता है?
- 5. लाइपोफेक्शन विधि में धनात्मक लाइपोसोम्स कणों का उपयोग क्यों किया जाता है?

12.8 अभ्यासार्थ प्रश्न:

- 1. निम्नलिखित प्रश्नों का संक्षेप में उत्तर दीजिये ।
- (i) ट्रांसजेनिक शब्द का उपयोग सर्वप्रथम किन वैज्ञानिकों ने किया ?
- (ii) ट्रांसफेक्शन (परासंक्रमण) किसे कहते हैं?
- (iii) DEAE का पूरा नाम लिखिये तथा यह किसलिये महत्वपूर्ण है?
- (iv) अस्थायी एवं स्थायी ट्रांसफेक्शन में अन्तर लिखिये ।
- (v) बायोरिएक्टर किसे कहते हैं?
- 2. ट्रांसजेनिक जन्तुओं को तैयार करने की विभिन्न विधियों का सचित्र वर्णन कीजिये।
- 3. निम्नलिखित पर टिप्पणी लिखिये-
- (i) कैल्सियम फॉस्फेट अवक्षेपण
- (ii) DNA -Dextran द्वारा ट्रांसफेमान
- (iii) लाइपोफेक्शन
- 4. विभिन्न प्रकार के ट्रांसजेनिक जन्तुओं के उपयोगों का वर्णन कीजिये।

औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रौद्योगिकी । मानव इन्सुलिन, इंटरफेरोन का उत्पादन ।

ANIMAL BIOTECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MEDICINES. PRODUCTION OF HUMAN INSULIN, INTERFERON.

इकाई की रूपरेखा

- 13.0 उद्देश्य
- 13.1 प्रस्तावना
- 13.2 औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रोद्योगिकी
- 13.3 इन्सुलिन
- 13.4 मानव (हयूमन) इन्स्लिन का उत्पादन
- 13.5 इटरफेरॉन
- 13.6 इंटरफेरॉन का उत्पादन
- 13.7 सारांश
- 13.8 शब्दावली
- 13.9 संदर्भ ग्रंथ
- 13.10 बोध प्रश्न
- 13.11 अभ्यासार्थ प्रश्न

13.0 उद्देश्य:

औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रौद्योगिकी - प्राणी जैव प्रौद्योगिकी में आनुवांशिक अभियांत्रिकी क्लोनिंग पुर्नयोजी डीएनए टेक्मोलॉजी एवं कोशिका व ऊतक संवर्धन विधियों द्वारा नई एवं उन्नत औषधियों का कम कीमत पर उत्पादन किया जाता है । इस तकनीक द्वारा फुट एंड माउथ डिजीज, ब्रुसेलोसिस, शिपिंग फीवर, फेलाइन ल्यूकेमिया एवं रेबीज जैसी बीमारियों के लिए टीका तैयार किया जाता है । शीध निदान किट एवं पुर्नयोजी प्रोटीन के विकास से चिकित्सा के क्षेत्र में एनीमल बायोटेक्मोलॉजी ने नए द्वार खोले है । आज अनेक फार्मास्यूटिकल कम्पनियाँ इन तकनीकों के आधार पर एन्जाइम्स, प्रतिजन, प्रतिरक्षी, टीके, हार्मोन्स एवं प्रोटीन का औद्योगिक उत्पादन कर रही है । जिन्हें क्लीनिकल ट्रायल्स में सफल होने, पर बाजार में बिक्री हेतु जारी कर दिया जाता है । योजना लागत, पेटेन्ट्स, क्लीनिकल ट्रायल्स इत्यादि के कारण ये उत्पाद महँगे भी हो सकते है और बाजार में बिक्री हेतु जारी होने में प्रायः समय लग जाता है

फिर भी महत्वपूर्ण उत्पाद होने के कारण बाजार में इनकी ऊँची माँग बनी रहती है । इन सभी के बारे में जानकारी प्राप्त करना इस अध्याय का उद्देश्य है ।

13.1 प्रस्तावनाः

इन्सुलिन हार्मोन डाइबिटिज मैलिटस के निदान में उपयोग आता है इस रोग से पीडित मरीज को इन्सुलिन रक्त में सीधे प्रवाहित किया जाता है जो ग्लुकोज की मात्रा को नियंत्रित करता है । इसका उत्पादन आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा किया जाता है । आजकल जीन स्थानान्तरण विधि द्वारा मानव इन्सुलिन का माइक्रोबियल उत्पादन बहु तायत में किया जा रहा है । आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा अन्य महत्वपूर्ण उत्पादन इन्टरफेरोन है । ये ग्लाइकोप्रोटीन है जो कि प्रतिरक्षी कोशिकाओं द्वारा उत्पादित की जाती है । ये रेबीज,जुकाम, कैंसर तथा इन्फल्एन्जा वाइरस के विरुद्व प्रभावी होते है ।

ट्रांसजेनिक प्राणी द्वारा उत्पादित प्रोटीन्स

प्रोटीन	एनीमल	उपयोग			
एंटीथ्रोम्बिन -।।।	बकरी	शल्य क्रिया में रूधिर की			
		आवश्यकता कम करता है ।			
फैक्टर-VIII,IX	भेड़, बकरी, सूअर	हीमोफीलिया के निदान में			
CFTR	भेड़	सिस्टिक फाइब्रोसिस के निदान में			
लैक्कटोफेरिन	गाय	कोरोनरी सर्जरी, नेचुरल			
एंटिबयोटिक्स					
α-1एन्टीट्रिप्सिन के	भेड़	सिस्टिक फायब्रोसिस एवं			
निदान में		एनफायसेमा			
लायसोस्टेफिन	गाय	एन्टीबैक्टीरियल्स की तरह जो गाय			
		में मैस्टीटाइटिस को रोकते है			
स्पाइडर सिल्क प्रोटीन	बकरी	अत्यंत मजबूत और काफी हल्के			
		भार चिकित्सा एवं औद्योगिक			
		महत्व के समान में			

पराजनी प्राणीयों द्वारा उत्पादित प्रोटीन्स के उत्पादन में कुछ खतरे भी शामिल होती है जो इस बात पर निर्भर करती है कि किस प्रकार के प्राणी को उपयोग में लिया गया है, आनुवांशिकी परिवर्धन किस प्रकार का है । प्रतिरक्षात्मक समस्याएं एवं विकास एवं स्वास्थ्य से जुड़ी हुई समस्याएं इत्यादि । अतः विभिन्न नियंत्रणकारी संस्थाएं जैसे - डब्ल्यू,एच.ओ., एफ.डी.ए., (फूड एवं ड्रग एडिमिनिस्ट्रेशन) डिपार्टमेन्ट ऑफ एग्रीकल्चर एन्वायरोन्मेन्टल प्रोटेक्कशन ऐजेंसी (ई.पी.ऐ) कोडेक्स ऐलीमेन्टेरियस कमीशन (CAC) इत्यादि क्लीनिकल ट्रायल में सफल होने पर ही इन्हें बाजार में बिकने योग्य घोषित करते है ।

13.2 औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रौधोगिकी :

औषधीय प्रोटीन्स का विश्व बाजार करीब 36000 बिलियन यू.एस.डॉलर ऑका गया है जिसमें इन्सुलिन प्रोटीन की हिस्सेदारी 13000 बिलियन न्यू.एस. डीलर है । फूड, टैक्सटाइल ओर डिटरजेन्टस में एन्जाइम्स का उपयोग 20 बिलियन यू.एस. डालर से भी अधिक का बाजार बनता है । विविध डायग्नोस्टिक किट्स एवं टीके का बाजार ही करीब 100 बिलियन डीलर का है । जैव प्रौधोगिकी द्वारा इन मॉलिक्यूल्स के उत्पादन को मॉलिक्यूलर फार्मिग (आण्विक खेती) कहा जाता है इन प्रोटीन्स का उत्पादन उचित बायोरिएक्टर में ही किया जाता है जिससे ये कम कीमत पर प्राकृतिक अवस्था में एलर्जी रहित उत्पादित हो सकें । प्लांट जैव प्रौद्योगिकी पर आधारित अणुओं खेती जैव प्रोद्योगिकी की तुलना में 1 / 30 गुना सस्ती है इसी प्रकार सूक्ष्मजीवी संवर्धन तंत्र की तुलना में यह 1 / 3 गुना सस्ती है । यदि पत्तियों या बीजों में मॉलिक्यूलर फार्मिंग कराई जाए तो इन्हें बिना रेफ्रीजेरेशन के लम्बे समय तक कम कीमत में स्टोर किया जा सकता है ।

अभिव्यक्ति	यीस्ट	बैक्टीरिया	पादप	टांसजेनिक	प्राणी	पराजीन प्राणी
तंत्र			वाइरस	पादप	कोशिका	
					संवर्धन	
लागत	कम	कम -	कम -	कम कमरे के	अधिक	अधिक कोई
भंडारण	-2.0°C	2.0°C	2.0°C	तापमान पर	लिक्विड	आवश्यकता
					नाइट्रोजन में	नहीं
जीन साइज	अज्ञात	अज्ञात	निश्चित	निश्चित नहीं	निश्चित	निश्चित
उत्पाद की	सामान्य	सामान्य	कम	कम	अधिक	अधिक
कीमत						
प्रोटीन लब्धि	अधिक	सामान्य	अत्यंत	अधिक	सामान्य से	अधिक
			अधिक		अधिक	
थैरेपेटिक	अज्ञात	ज्ञात	अज्ञात	अज्ञात	ज्ञात	ज्ञात
रिस्क						

कीमती उत्पादों का बड़े स्तर पर उत्पादन करने के लिए और उनकी प्रभावितता जाँचने के लिए प्राणी जैव प्रौधोगिकी का प्रबल महत्व बना हु आ है । प्राणी कोशिका प्रभाव कारी ढंग से प्रोटीन स्त्रावित / उत्पादित करती है । उनके द्वारा किया गया ग्लायकोसायलेशन, फॉस्कोरायलेशन एवं अन्य फेरबदल बेहतर होता है । जबिक बैक्टीरिया प्रोटीन का गलायकोसायलेशन / फॉस्फोरॉयलेशन नहीं कर पाते है, यीस्ट जिटल ग्लायकोसायलेशन नहीं कर पाती है, हालांकि यीस्ट कोशिका ग्लाइकोसायलेशन तो कर देती है कि किन्तु वह अपने पर खरा नहीं होता है । इसके अलावा प्राणी कोशिका की बाह्य आकृति एवं प्रकृति सूक्ष्मजीवियों से भिन्न होती है प्राणी कोशिका बाह्य कोशिका आधात्री स्त्रावित करती है । जो कोशिका को एक माध्यम प्रदान करता है । जिसमें वे परस्पर क्रिया कर सकती है एवं प्रवास भी कर सकती है ।

प्राणी कोशिका संवर्धन के लिए वृद्धि एन्वायरमेन्ट (वातावरण) भी महत्वपूर्ण भूमिका अदा करता है क्योंकि यह वृद्धि को मंद / तीव्र / उत्तेजित कर सकता है जिससे कोशिका एपोप्टोसिस (निर्धारित कार्यक्रम के अनुसार मृत्यु) नैक्रोसिस (असामायिक मृत्यु) या विभेदीकरण (डिफरेन्शिएंशन) की ओर अग्रसर हो सकती है। प्राणी कोशिका कल्चर भी सूक्ष्मजीवी कोशिका संवर्धन की तरह एक जैसी काइनेटिक्स (गतिकी) का अनुसरण करता है किन्तु कोशिका चक्र अविध प्रोकेरिओटिक कोशिका की बजाय यूकेरिओटिक कोशिका में अधिक होती है। इसी तरह भिन्न-भिन्न एक्सप्रैशन सिस्टम बायोरिएक्टर जिसमें आणविक खेती की जा रही है के लिए जाने पर उनसे उत्पादित उपचारिक मॉलिक्यूल्स रोग में एलर्जी उत्पन्न कर सकते है। अतः रोगी से अधिकाधिक आनुवंशिक समानताओं वाले अभिव्यक्ति तंत्र उपयोग में लाए जाते है। इसी क्रम में स्तम्भ कोशिकाओं ने आशाओं के नए द्वारा खोल दिये है। क्योंकि रोगी से ली गयी स्तम्भ कोशिकाओं से उत्पादित मेडिसिन / थेरेपेटिक मॉलिक्यूल एलर्जी उत्पन्न नहीं करते है अतः विभिन्न अवशीतलीकरण प्रयोगशालाएँ स्तम्भ कोशिका का भंडारण करती है इन्हें स्तम्भ कोशिका बैंक कहते है।

उक्त अनेक ज्ञात और अज्ञात जिटलताओं के चलते पादप जैव प्रौधोगिकी या सूक्ष्मजीवी जैव प्रौधोगिकी की बजाय प्राणी जैव प्रौधोगिकी से मॉलिक्यूलर फार्मिंग सुविधाजनक होती है। इन औषिधयों के अच्छे / बुरे प्रभावों की जानकारी हेतु क्लीिनकल टेस्ट्स भी प्राणी / प्राणी टिश्यू पर ही किए जाते है अतः प्राणी जैव प्रौधोगिकी का महत्व अत्याधिक है। पुर्नयोजी प्रोटीन (औषिधयों) के उत्पादन के लिए दूध, ऐग व्हाइट, (अण्डे का सफेद भाग), रूधिर, सेमिनल प्लाज्मा, सिल्क वर्म कोकृन इत्यादि प्राणी जैव प्रौधोगिकी के लिए मनपंसद स्त्रोत होते है।

अनेक औषियों को सिक्रय नहीं बिल्क आंशिक सिक्रय अवस्था में उत्पादित किया जाता है । मॉलिक्यूलर फार्मिग द्वारा औषधी निर्माण में कई प्रकार की समस्याओं का सामना करना पड़ता है जैसे कई बार उपयुक्त अभिव्यक्ति वाहक नहीं मिलने के कारण सही प्रोटीन का निर्माण नहीं होता है । जीन YAC या BAC का उपयोग करने पर भी प्रोटीन की संतोष जनक अभिव्यक्ति नहीं हो पाती है । जीन में विविध संकेतों को पहचानने की अभी भी काफी आवश्यकता है । कुछ कोशिकाओं द्वारा स्त्रावित कोलीजिनेज ट्रिप्सिन, इत्यादि एन्जाइम बाहय कोशिका आधात्री को भारी नुकसान पहुँ चाते है । कोशिका के विकास के लिए उचित तापमान, गैस मिश्रण, PH ग्लूकोज, वृद्धि कारक एवं पोषक तत्वों इत्यादि की आवश्यकता होती है । रूधिर / सीरम इत्यादि से वृद्धि कारक प्राप्त किए जा सकते है ।इन समस्याओं के समाधान के लिए नित नए तरीके खोजे जाते है ।

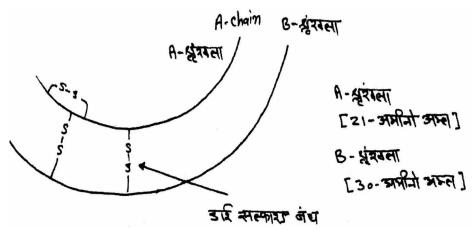
जैसे आदर्श परम्परागत उपकरणों का विकास माइक्रोकैरिअर का विकास माइक्रो ऐनकैप्शूलेशन तकनीक का विकास हाइब्रिडोमा तकनीक का विकास, सीरम रहित मीडियम (माध्यम) या सस्ते एवं उपयुक्त माध्यम का विकास कल्टीवेशन (कार्मिग खेती) एवं प्यूरीफीकेशन (शुद्धिकरण) तकनीकों का विकास इत्यादि ।

इस तरह कोशिका सतही प्रतिजीनी पॉलीपेप्टाइड ग्रोथ हॉर्मोन, एन्जाइम, इम्यूनोरेग्यूलेटरस, वायरल बायोइन्सैक्टीसाइड्स, ट्यूमर एन्टीजन्स, एवं सैल मास का व्यवसायिक उत्पाद की तरह निर्माण किया जाता है।

13.3 इन्स् लिन :

अग्नाशय मे लैगंरहैंस द्वीप समूह की बीटा कोशिकाएं इन्सुलिन हार्मोन स्त्रावित करती है । बेंटिग और बेस्ट ने 1920 में इन्सुलिन हार्मोन की खोज की थी । सेंगर ने बताया कि इन्सुलिन में दो पोलीपेप्टाइड श्रृंखला होती है और कुल 51 ऐमीनो अम्ल होते है । इन्सुलिन हार्मोन ग्लूकोज का नियमन करता है और चिकित्सा के क्षेत्र में डायबिटीज मेलीटस और फेमिलियल हायपरइन्सुलिनेमिया के निदान में उपयोग में आता है ।

चित्र 13.1



प्रथम प्रकार की डायबिटीज स्वतःप्रतिरक्षी प्रकार का रोग है जिसमें शरीर अग्नाशय की बी' कोशिकाओं को गलती से नष्ट कर देता है अत्ः ऐसे रोगियों मे तो इन्सुलिन बन ही नहीं पता है जबिक द्वितीय(सैकेण्ड) प्रकार डायबिटिज में इन्सुलिन तो बनता है किन्तु शरीर उसे उपयोग में नहीं ले पाता है।

अनेक कशेरुकी इन्सुलिन हार्मोन का उत्पादन करते है। पश्च अनुवादन नियंत्रण, ऐमीनो अश्व ऐमीनो अम्ल का क्रम इत्यादि अनेक कारणों से इन प्राणीयों के इन्सुलिन की मॉलिक्यूलर स्ट्रक्चर में थोड़ी भिन्नता हो सकती है। अनेक फार्मास्यूटिकल कंपनी बाजार में बोवाइन इन्सुलिन और पोसींन इन्सुलिन उपलब्ध करवाते है। जो आज भी मरीजों द्वारा उपयोग में लाएं जाते है। बोवाइन इन्सुलिन ह्यूमन इन्सुलिन की तुलना में केवल तीन ऐमीनो अम्ल के संदर्भ में भिन्नता रखता है (A- 8 ऐलेनिन, A- 10 वेलिन B -30 ऐलेनिन) जबिक पोर्सीन (सूअर) इन्सुलिन ह्यूमन इन्सुलिन की तुलना में मात्र एक ऐमीनो अम्ल के संदर्भ में भिन्नता रखता है। (बी चेन में 30 वें क्रम पर ह्यूमन इन्सुलिन में थ्रिओनिन ऐमीनो ऐसिड है जबिक पोर्सीन इन्सुलिन में इस स्थान पर ऐलेनिन ऐमीनो अम्ल है) बोवाइन या पोर्सीन इन्सुलिन को मरीजो दवारा उपयोग में लेने पर वे दोनो ही दक्ष (उपयुक्त) पाये गए है अब तक हुई रिसर्च के अनुसार ऐसे मरीजो में तुलनात्मक रूप से कोई अपसामान्यता या ऐलर्जी जैसे लक्षण नहीं पाए गए है। लेकिन इन हार्मोन्स को क्रोमेटोग्राफी (HPLC) एवं अन्य तकनीकों द्वारा 100 प्रतिशत दक्षता से शुद्ध संघटन में किसी अन्य अणु की अशुद्धि भी हो तो ये मरीजो में एलर्जी उत्पन्न कर सकते है। हालाँकि बीफ इन्सुलिन एवं पोर्सीन इन्सुलिन भी मानव शरीर के लिए बाहय अणु ही है लेकिन

मानव शरीर का प्रतिरक्षी तंत्र इन्हें प्रतिजन नहीं बनाता है । सन् 1980 में बोवाइन इन्सुलिन और पोर्सीन इन्सुलिन बाजार में उपलब्ध हो जा गए थे । एलर्जिक प्रभावों को कम करने के लिए एवं अधिक क्षमता के लिए ह्यूमन इन्सुलिन का निर्माण किया गया और इसी के FDA साथ से स्वीकृति मिलने के बाद सन, 1982 में सर्व प्रथम Eli Lilly फार्मास्यूटिकल कपंनी ने आनुवांशिक अभियांत्रिकी के प्रथम औषधीय उत्पाद ह्यूमन इंसुलिन को बाजार में बिक्री हेतु जारी कर दिया जिसका नाम ह्यूमुलिन रखा गया ।

1.34 मानव (हयूमन) इंसुलिन का उत्पादनः

मानव कोशिका में 11 वें गुणस्त्र (क्रोमोसोम) की लधु भुजा के टीलोमीयर के निकट इन्सुलिन को कूट करने वाले जीन पाई जाती है । इस जीन में 153 न्यूक्लियोटाइड होते है जिसमें 63 ए' श्रृंखला के लिए होते है जबिक 90 बी श्रृंखला के लिए होते है । इन्सुलिन प्रोटीन का अण्भार 5808 डाल्टन होता है ।

जीन पृथककरण उपयुक्त रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिऐज एंजाइम की सहायता से इंसुलिन को कूट करने वाली जीन को गुणसूत्र से पृथक कर लिया जाता है। इस तरह ए' श्रृंखला के लिए एवं बी' श्रृंखला के लिए अलग-अलग जीन प्राप्त हो जाती है। सन् 1978 से हमारे पास ऐसी तकनीके है कि हम प्रयोगशाला में ही ए' एवं बी' जीन का कृत्रिम संश्लेषण कर सकते हैं।

चित्र 13.2

रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिऐज एंजाइम की सहायता से इंसुलिन को कूट करने वाली जीन को गुणसूत्र से पृथक करना

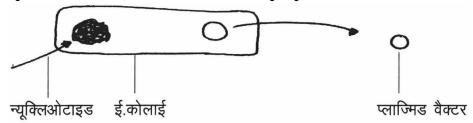


ए' श्रृंखला और बी' श्रृंखला के लिए ली गई जीन में टर्मिनेशन कोडोन फिट किए जाते है जो ट्रांसलेशन को रोकने का सिग्नल देंगे।

इन दोनो जीन की अभिट्यक्ति ग्राम नैगेटिव बैक्टीरिया ई.कोलाई में कराया जाता है ।ई.कोलाई में प्लाज्मिड पाया जाता है जिस पर बीटा' गेलेक्टोसाइडेज जीन भी पाई जाती है इसी के साथ लैक प्रमोटर भी पाया जाता है जो बी' गेलेक्टोसाइडेज जीन का अभिट्यक्ति करवाता है यदि इसी जीन में इंसुलिन को कूट करने वाली (ए' श्रृंखला / बी' श्रृंखला) जीन भी इन्सर्ट (डाल देना) कर दी जाएं तो लैक प्रमोटर बीटा गेलेक्टोसाइडेज जीन के साथ-साथ इन्सुलिन जीन का अभिट्यक्ति भी करवा देता है । ऐसी दशा में ई.कोलाई फ्यूज प्रोटीन' उत्पादित करेगा जिसमें

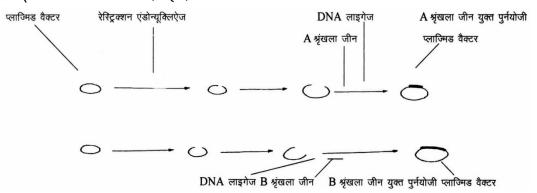
बीटा' गैलेक्टोसाइडेज प्रोटीन और इंसुलिन श्रृंखला प्रोटीन संगलित होंगी । इस संगलन प्रोटीन से इंसुलिन श्रृंखला प्रोटीन को कुशलता पूर्वक अलग करने के लिए- ए' श्रृंखला जीन एवं बी' श्रृंखला जीन के शुरूआती सिरे पर मिथियोनिन इनिशिऐशन कूट लगा दिया जाता है । संगलन प्रोटीन में मेथियोनिन की स्थिति का पता लगाकर इन्सुलिन प्रोटीन और बी' गैलेक्टोसाइटेज प्रोटीन को अलग-अलग पहचान कर सही स्थान पर कट लगाया जा सकता है और इन्सुलिन श्रृंखला प्रोटीन अलग प्राप्त की जा सकती है।

वैक्टर पृथक्करण- ई. कोलाई बैक्टीरिया से वैक्टर को पृथक्कृत कर लिया जाता है।



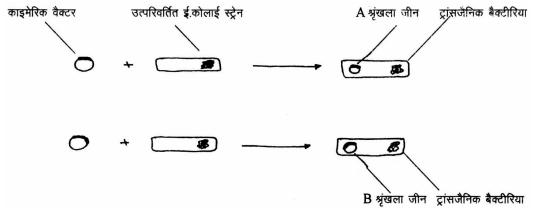
चित्र 13.3 वैक्टर पृथककरण

पूर्नयोजी डीएनए का निर्माण- जैसा कि अभी बताया गया है कि ए' श्रृंखला जीन एवं बी' श्रृंखला जीन में टर्मिनेशन कूट एवं मिथियोनिन इनिहिबेशन कूट लगा दिये जाते है । अब A श्रृंखला व B श्रृंखला जीन को प्लाज्मिड में डाल दिया जाता है । इस हेतु रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएज एंजाइम द्वारा प्लाज्मिड को काटा जाता है जीन को वांछित स्थान पर जोड़ने के लिये DNA लाइगेज एंजाइम का प्रयोग किया जाता है ।



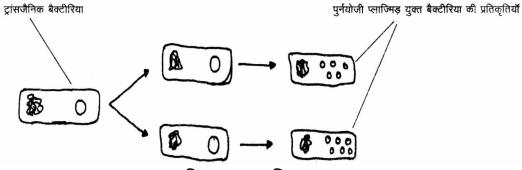
चित्र 13.4 पुर्नयोजी डीएनए के निर्माण की विधि

पुर्नयोजी वैक्टर का पोषी कोशिका में स्थानान्तरण- अब उक्त पुर्नयोजी वेक्टर को अलग-अलग ई. कोलाई बैक्टीरिया में डाल दिया जाता है । ई.कोलाई यही पोषी कोशिका की तरह काम आ रही है अब यही बैक्टीरिया इन्सुलिन का उत्पादन करेगा अतः इसे बायोरिएक्टर भी कहा जा सकता हैं । यह बैक्टीरिआ एक ऐसा एन्जाइम उत्पादित करता है जो इसमे बनने वाली इंसुलिन को तोइना शुरू कर देता है । अतः प्रयोग में ऐसी उत्परिवर्तित ई.कोलाई स्ट्रेन काम मे ली जाती है जो ऐसे एंजाइम का उत्पादन नहीं करती है ।



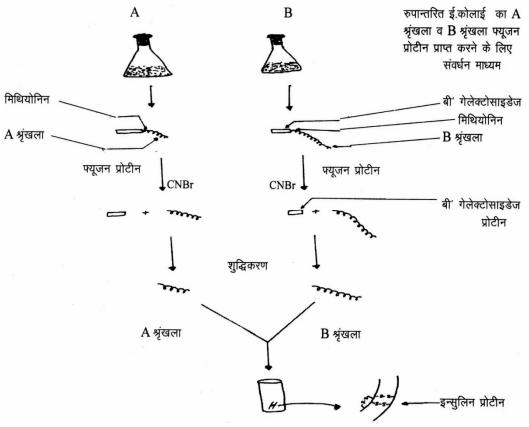
चित्र 13.5 पूर्नयोजी वैक्टर का पोषी कोशिका में स्थानान्तरण की विधि

प्लाज्मिड़ गुणन (मल्टीप्लिकेशन) - पुर्नयोजी प्लाज्मिड़ बैक्टीरिया के अंदर अपनी अनेक प्रतिकृति बना लेता है । बैक्टीरिया कोशिका में विभाजन के साथ ही हर बार प्लाज्मिड़ भी अपनी एक प्रतिकृति नई कोशिका में स्थानान्तरित कर देता है । इस तरह इन्सुलिन श्रृंखला A / B जीन की भी स्वतः ही बहुत सी प्रतिकृतियाँ बन जाती है ।



चित्र 13 .6 प्लान्मिड़ गुणन

मानव इंसुलिन का उत्पादन - ट्रांसजैनिक बैक्टीरिया को उपयुक्त संवर्धन माध्यम में आदर्श परिस्थितियों में (आदर्श तापक्रम व PH पर) संवर्धन कराया जाता है । इस दौरान बैक्टीरिया अपनी अनेक जीनों की अभिव्यक्ति करता है । उनके साथ ही संगलन प्रोटीन (गैलक्टोसाइडेज प्रोटीन + इन्सुलिन शृंखला प्रोटीन जुड़ी हुई का भी उत्पादन होता है । अन्य प्रोटीनों की तरह इस प्रोटीन को भी बैक्टीरिया के प्रोटोप्लाज्म में देखा जा सकता है । संगलन प्रोटीन प्राप्त करने के लिए बैक्टीरिया कोशिका को तोड़ दिया जाता है और अब विविध मेटाबोलाइट्स के इस मिश्रण में से संगलन प्रोटीन को पृथक कर लिया जाता है ।



चित्र 13.7 मानव एन्स्लिन का उत्पादन

HPLC विधि द्वारा इन्सुलिन श्रृंखला ए' अथवा बी' को बी' गेलेक्टोसाइडेज से अलग करने के लिए इसे CNBr, से अभिकृत करा दिया जाता है । परखनली में ए' श्रृंखला और बी' श्रृंखला को मिश्रित होने दिया जाता है जिससे इनमें उपयुक्त डाई सल्फाइड बंध बन जाते है और इन्सुलिन प्रोटीन बन जाती है ।

इस तरह मानव इन्सुलिन का उत्पादन कर लिया जाता है इन्सुलिन श्रृंखला ए' एवं बी' का आकार छोटा होने के कारण ई.कोलाई का प्लाज्मिड ऐसे DNA का आसानी से वहन कर लेता है और उसका अभिव्यक्ति भी करवा देता है । अतः जटिलताएं कम हो जाती है । मानव शरीर के अंदर बनने वाले इन्सुलिन का भी पश्च अनुवादन रूपान्तरण नहीं होता है अतः बैक्टीरिया में उत्पादित इस मानव इन्सुलिन में भी कोई रूपान्तरण (कार्बोहाइड्रेट रेजीड्यू जोड़ने / घटाने) की आवश्यकता नहीं रह जाती है ।

भावी सम्भावनाएँ- अन्य पोषी कोशिका (यीस्ट एवं अन्य यूकेरिओटिक कोशिका) में किसी अन्य बेहतर वेक्टर को इन्सुलिन निर्माण के लिए उपयोग में लाया जा चुका है । बेहतर उत्पादन के लिए आदर्श परिस्थितियों के लिए सोचा जा सकता है । इस तरह प्राप्त इंसुलिन के साथ अन्य अशुद्धियों के निवारण के लिए अन्य बेहतरीन शुद्धिकरण तकनीकों के पर अनुसंधान जारी है । जिससे अनचाहे इम्यून रेस्पोंस (एलर्जी) की सम्भावनाओं को खत्म या कम किया जा सकता है । अन्तिम चरण में इंसुलिन शृंखला ए' एवं बी' के मध्य डाइसल्फाइड बंध बनते है वस्तुत: यह एक

अकुशल प्रक्रिया है इसके निदान के लिए इंसुलिन का उत्पादन एक अन्य विधि से भी किया जाता है। मानव शरीर में प्राकृतिक अवस्था में प्रोइन्सुलिन 109 ऐमीनो अम्ल से बनता हैं जिससे कुछ ऐमीनो अम्ल हटा दिए जाने के बाद प्रोइन्सुलिन 86 ऐमीनो एसिड अम्ल का बन जाता है। प्रोइन्सुलिन में ए' एवं बी' शृंखला के अलावा सी' शृंखला भी होती है जिसे बाद में विदलित कर दिया जाता है और अन्त में केवल ए' एवं बी' शृंखला युक्त इंसुलिन बनता है। इस जानकारी पर आधारित इंसुलिन बनाने के लिए प्रोइन्सुलिन रिडिंग फेम को ही संश्लेषित कर लिया जाता है इसे एक्सप्रैस्ड उत्पाद में बी' शृंखला - सी' शृंखला - ए' शृंखला होती है। प्रोटीओलाइटिक विदलन से सी शृंखला को काट दिया जाता है इस तरह बनी इंसुलिन में डाइसल्फाइड बंध के बाद अधिक दक्ष त्रिविम संरचना बनती है।

इंसुलिन प्रोटीन को ओरल पिल (गोली) के रूप में नहीं लिया जा सकता है क्योंकि आहारनाल में इसका प्रोटोआइटिक विदलन हो जाता है । इंसुलिन को अधिक मात्रा में लिए जाने पर यह मानव शरीर पर कुप्रभाव भी डाल सकती है ।अतः ऐसे पुर्नयोजी प्रोटीनों की अक्रिय अणु का उत्पादन श्रेयस्कर विकल्प है जिसे शरीर केवल आवश्यकता पड़ने पर सक्रिय अवस्था में बदल सके ।

13.5 इंटरफेरॉन :

इंटरफेरॉन प्राकृतिक ग्लायकोप्रोटीन है जिन्हें सायटोकाइन भी कहा जाता है अनेक कशेरूकी की प्रतिरक्षी कोशिकाएं इनका उत्पादन करती है । एक अनुमान के अनुसार इंटरफेरोन का सालाना व्यावसायिक कारोबार लगभग 5 बिलियन डीलर का है इस तरह इंसुलिन के बाद इंटरफेरोन आनुवांशिक अभियांत्रिकी का दूसरा सब से बड़ा सफल उत्पाद है । कशेरूकी की प्रतिरक्षी बाएं वायरस परजीवी ट्यूमर कोशिका के खिलाफ इंटरफेरॉन का उत्पादन करती है आणविक स्तर पर कहा जा सकता है कि वायरल ग्लाकोप्रोटीन वायरल RNA बैक्टीरियल एण्डोटोक्सिन बैक्टीरिअल फ्लेजैला CPG साइट्स इत्यादि प्रतिरक्षी कोशिकाओं को इंटरफैरॉन के उत्पादन के लिए प्रेरित करती है । इंटरफेरॉन निम्न कार्य करता है-

- वायरल प्रतिकृति का संदमन
- प्राकृतिक मारक कोशिका और मैक्रोफेज (प्रतिरक्षी कोशिकाओं) को सक्रिय करना
- लिस्फोसाइट्स को प्रतिजन प्रस्तुतिकरण में सहायता एवं प्रेरक
- पोषी कोशिका को वायरल संक्रमण के प्रति प्रतिरोध करता है ।
- अर्बुद कोशिका के खिलाफ (एण्टीओंकोजेनिक)
- MHC-1 एवं MHC -II को बढावा

रिसैप्टर के आधार पर इंटरफेरोन निम्न प्रकार के होते है:-

INF-I INF alpha INF beta INF omega

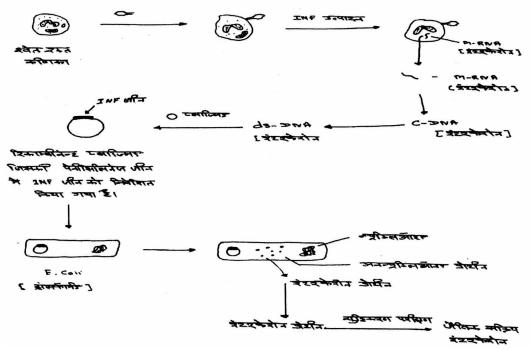
INFII INF gama

INF-III

 आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा बनाए गए इंटरफेरॉन इंटरफैरॉन को इंट्रामस्कुलर / इंट्राडर्मल इंजैक्शन द्वारा शरीर में पहुंचाया जाता है ।

13.6 इंटरफेरॉन का उत्पादन:

वायरल संक्रमण से श्वेत रक्त कणिकाएँ प्रेरित की जाती है । अतः इस कोशिका से इंटरफेरॉन के लिए बनाए गए एम.आर.एन.ए. को निष्कासित कर दिया जाता है । इस एम.आर.एन.ए. से पूरक डी.एन.ए. का निर्माण कर लिया जाता है । इस डी.एन.ए. को डबल स्ट्रेण्ड डी.एन.ए. में परिवर्तित कर दिया जाता है इस डबल स्ट्रेण्ड डी.एन.ए. में कुछ न्यूक्लिओयर क्रम में जोड़ दी जाती है । जिससे इंटरफेरॉन प्रोटीन की सही अभिव्यक्ति हो सके जैसे प्रमोटर क्रम, राइबोसोम बाइडिंग साइट्स लिंकर मोलिक्युल्स इत्यादि इस जीन क्रम को प्लाज्मिड वैक्टर से जोड़ दिया जाता है और इस तरह प्राप्त हुए पुर्नयोजी वेक्टर द्वारा बैक्टीरिया का रूपान्तरण कर दिया जाता है । इस तरह कुछ अज्ञात प्रोटीन के साथ इटरफेरॉन को प्राप्त कर लिया जाता है । इस तरह कुछ अज्ञात प्रोटीन के साथ इटरफेरॉन को प्राप्त कर लिया जाता है । इसे पृथक्करण और शुद्धिकरण द्वारा शुद्ध संघटन में प्राप्त कर लिया जाता है ।



चित्र 13.8 इंटरफेरॉन का उत्पादन

सन् 1980 में इंटरफेरॉन का जेनेटिक इंजीनियरिंग द्वारा बैक्टीरिया में उत्पादन किया गया । सन् 1986 में इंटरफेरॉन का रेबीज, जुकाम (कॉमन कोल्ड वायरस) और कैंसर के लिये परीक्षण किया गया । किसी भी एक प्रकार का इंटरफेरोन अनेक विभिन्न वायरसों के विरूद्ध प्रभावी पाया गया है । इंटरफेरॉन वायरस प्रजातिय विशिष्ट होता है । इंटरफेरॉन इन्फ्लूऐंजा वायरस के विरूद्ध भी प्रभावी पाया गया है । इंटरफेरॉन का उत्पादन किया जा चुका है ।

13.7 सारांश:

औषधीय उत्पादन में प्राणी जैव प्रौद्यौगिकी - प्राणी जैव प्रौद्योगिकी में आनुवांशिक अभियांत्रिकी क्लोनिंग पुर्नयोजी डीएनए टेक्नोलॉजी एवं कोशिका व ऊतक संवर्धन विधियों द्वारा नई एवं उन्नत औषधियों का कम कीमत पर उत्पादन किया जाता है। इस तकनीक द्वारा फुट एंड माउथ डिजीज, ब्रुसेलोसिस., शिपिंग फीवर, फेलाइन, ल्यूकेमिया एवं रेबीज जैसी बीमारियों के लिए टीका तैयार किया जाता है। शीध्र निदान किट एवं पुर्नयोजी प्रोटीन के विकास से चिकित्सा के क्षेत्र में एनीमल बायोटेक्मोलॉजी ने नए दवार खोले है।

जन्तु जैव प्रौद्योगिकी में आनुवांशिक अभियांत्रिकी, आर.डी.टी एवं कोशिका / ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा नई एवं उन्नत औषिधयों का कम कीमत पर उत्पादन किया जाता है । इसका प्रमुख उदाहरण इन्सुलिन का आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा उत्पादन है । इन्सुलिन जीन को अलग कर वाहक प्लाज्मिड में डाल कर काइमेरिक जीन का निर्माण कर इसे पोषी कोशिका में स्थानान्तरित कर इन्सुलिन का उत्पादन किया जाता है ।इसी प्रकार वाइरल संक्रमण से श्वेत रुधिर कणिका को इंटरफेरॉन के उत्पादन के लिए प्रेरित किया जाता है ।

13.8 शब्दावली :

इंटरफेरॉन- इंटरफेरॉन प्राकृतिक ग्लायकोप्रोटीन है जिन्हें सायटोकाइन भी कहा जाता है अनेक कशेरूकी की प्रतिरक्षी कोशिकाएं इनका उत्पादन करती है।

हय्मुलिन- आनुवांशिक अभियांत्रिकी के प्रथम औषधीय उत्पाद हयूमन इंसुलिन को बाजार में बिक्री हेतु जारी कर दिया गया ह जिसका नाम हयूमुलिन रखा गया ।

वैक्टर पृथक्करण- ई. कोलाई बैक्टीरिया से वैक्टर को पृथक करने को कहते है । इन्सुलिन - अग्नाशय मे लैगंरहैंस द्वीप समूह की बीटा कोशिकाएं इन्सुलिन हार्मोन स्त्रावित करती है ।

13.9 संदर्भ ग्रंथ :- TA Brown - Gene Cloning, DNA Analysis

13.10 बोध प्रश्न:

- 1. मानव इंसुलिन में पाए जाने वाले ऐमीनो अम्ल की संख्या है -
 - (a) 31
 - (b) 41
 - (c) 51
 - (d) 61
- 2. इंसुलिन का उत्पादन अग्नाशय की निम्न कोशिकाओं में होता है
 - (a) अल्फा कोशिका
 - (b) बीटा कोशिका
 - (c) गामा कोशिका
 - (d) सभी में
- 3. जैव रासायनिक रूप से इंटरफेरॉन क्या है
 - (a) प्रोटीन
 - (b) कार्बोहाइड्रेट

- (c) लिपिड
- (d) विटामिन

लघु प्रश्न:

- 1. इंसुलिन की संरचना व कार्य बताइये।
- 2. इंटरफेरॉन की उपयोगिता बताइये ।

13.11 अभ्यासार्थ प्रश्न:

- 1. मानव इंसुलिन के उत्पादन पर प्रकाश डालिये।
- 2. इंटरफेरॉन के उत्पादन को समझाइये।
- 3. प्राणी जैव प्रौद्योगिकी का पुर्नयोजी प्रोटीन के उत्पादन में योगदान बतलाइये ।

वैक्सीन, प्रतिजैविक ,प्रतिजन व प्रतिरक्षी तथा एन्जाइम का उत्पादन ।

PRODUCTION OF VACCINE, ANTIBIOTICS, ANTIGENS AND ANTIBODIES, ENZYMES

इकाई की रूपरेखा

- 14.0 उद्देश्य
- 14.1 वैक्सीन
- 14.2 प्रतिजैविक
- 14.3 प्रतिजन व प्रतिरक्षी
- 14.4 एन्जाइम
- 14.5 सारांश
- 14.6 शब्दावली
- 14.7 संदर्भ ग्रन्थ
- 14.8 बोध प्रश्न
- 14.9 अभ्यासार्थ प्रश्न

14.0 उद्देश्य

प्रस्तुत इकाई उपरोक्त पुर्नयोजी थेरेपेटिक्स दवाईयाँ के उत्पादन पर प्रकाश डालती है। जैव प्रौद्योगिकी द्वारा ऐसी प्रोटीन का निर्माण संभव हुआ है जिनका अनेक रोगों में व्यापक महत्व है सामान्यतया प्राकृतिक अवस्था में ऐसी प्रोटीन बिल्कुल नई खोज भी हो सकती है और यह भी संभव हो सकता है कि प्राकृतिक अवस्था में इनका जीव में अत्यन्त अल्प उत्पादन ही होता है। कुछ जटिल रोगों के इलाज में ऐसे ही कुछ पुर्नयोजी अणु एक मात्र विकल्प होते है। ऐसी परिस्थिति में इनका बडे स्तर पर उत्पादन आवश्यक हो जाता है। अतः ऐसे पुर्नयोजी थेरेपेटिक्स के संश्लेषण का वैज्ञानिक आधार ढूंढ कर प्रक्रिया को दक्ष और सस्ता बनाने का प्रयास निरंतर जारी है।

14.1 प्रस्तावना :

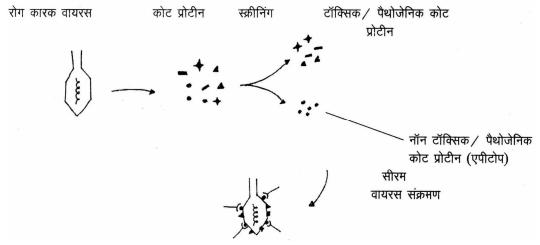
जैव प्रौद्योगिकी के अन्तर्गत वैक्सीन एण्टीबायोटिक आदि का मानव कल्याण के लिए अध्ययन किया जाता है। कई प्रकार के वाइरस व बैक्टीरिया जनित रोगों के रोगाणुओं के प्रति तत्सम्बन्धित वैक्सीन तैयार कर रोग पैदा होने से पूर्व व्यक्ति में प्रतिरोधक क्षमता विकसित कर दी जाती है। एण्टीबायोटिक वे रसायन है जोकि जिवाणुओं की वृद्धि को रोकते हैं तथा उन्हें नष्ट कर देते है।

14.2 वैक्सीन:

वैक्सीन में ऐसे प्रतिजन होते है जो शरीर को इम्यून सिस्टम (प्रतिरक्षी तंत्र) को संक्रमण के विरुद्ध प्रतिरक्षी

बनाने के लिए प्रेरित करते है किन्तु रो स्वयं संक्रमण नहीं करते है ।एक आदर्श वैक्सीन में निम्नलिखित गुण होने चाहिए-

- यह टोक्सिक / पैथोजनिक नहीं होनी चाहिए ।
- इसके साइड इफैक्ट्स (कुप्रभाव) नहीं होने चाहिए ।



14.1 वैक्सीन उत्पादन की तकनीक

- यह जीव के प्रतिरक्षी तंत्र (Immune system) में कोई समस्या उत्पन्न नहीं करना चाहिए।
- वैक्सीन का इम्यूनाइजेशन प्रभाव लम्बे समय तक शरीर में बना रहना चाहिए ।

वैक्सीन का उत्पादन- 1987 में FDA (Food and Drug Administration, USA) ने प्रथम जेनेटिक इंजिनियर्ड वैक्सीन " हिपेटाइटिस बी' को मंजूर किया और इसी के साथ इस वैक्सीन का प्रयोग मनुष्य में इम्यूनाइजेशन के लिए किया जाने लगा । वास्तव में इम्यूनाइजेशन के लिए समस्त वायरस कण / बैक्टीरिया के बजाय पैथोजन की प्रोटीन / प्रोटीन का छोटा टुकड़ा / पेप्टाइड, एपीटोप के रूप में लिया जा सकता है । यह पोलीपेप्टाइड शरीर में रोग कारक का संक्रमण करने मे समर्थ नहीं होना चाहिए लेकिन शरीर का प्रतिरक्षी तंत्र इसके विरूद्ध एंटीबॉडी (प्रतिरक्षी) बनाने में इस तरह समर्थ होना चाहिए कि भविष्य में कभी ऐसे पैथोजन से संक्रमण होने पर वह फिर से ऐसे ऐपीटोप को पहचान कर उन्हें न्यूट्रिलाइज कर सके । ऐसे पोलीपेप्टाइड को कोड करने वाली प्रमुख जीन का पता लगा कर इसे किसी वेक्टर के साथ जोड़ दिया जाता है और पुर्नयोजी वेक्टर से किसी पोषी कोशिका इत्यादि को स्थानान्तरित कर दिया जाता है । पोषी कोशिका से इस थैरेपेटिक प्रोटीन उत्पाद को निष्काषित कर लिया जाता है और विभिन्न शुद्धिकरण प्रक्रमों के बाद इसका शुद्ध संगठन प्राप्त हो जाता है अब इसके वैक्सीन की कसौटी पर खरा उतरने पर नियामक संस्थाओं से मंजूरी प्राप्त होने के बाद बाजार मे उतार दिया जाता है ।

1. क्लॉस्ट्रीडियम डिफिसाइल टॉक्सिन-A वैक्सीन - इस वैक्सीन को प्राप्त करने के लिए इस वैक्टिरिया की जीनोमिक लाइब्रेरी तैयार कर ली जाती है । एण्टी टॉक्सिन A की मदद से टॉक्सिन

A को कूट करने वाली जीन को स्क्रीन कर लिया जाता है । यह. लगभग 0.3 किला क्षार युग्म होता है । इसे रेस्ट्रिक्शन एण्डोन्यूक्लिएंज एन्जाइम द्वारा पृथक किया जा सकता है और जीन क्लोनिंग द्वारा टॉक्सिन A उत्पादित कर लिया जाता है । वेस्ट्रेन ब्लाटिंग तकनीक द्वारा इसे शुद्ध अवस्था में प्राप्त कर लिया जाता है और वैक्सीन की तरह प्रयुक्त किया जाता है ।

- 2. **पाद एवं मुख रोग के लिए वैक्सीन** :- यह एक वाइरस जिनत रोग है इस वायरस में न्यूक्लिक अम्ल ओर चार प्रकार की कूट प्रोटीन पाई जाती है जिनमें से VP_3 कूट प्रोटीन परिक्षण जीव में संक्रमण किए बिना इम्यूनिटी उत्पन्न करती है । वैक्सीन बनाने के लिए VP_3 कूट प्रोटीन का प्रयोग किया जाता है इसके लिए इस प्रोटीन को कूट करने वाली जीन को पृथक करके प्लाज्मिड में जोड़ कर इसका उत्पादन कराया जाता है ।
- 3. मलेरिया वैक्सीन एक बेहतरीन ऐपीटोप (प्रतिजन का वह भाग जो प्रतिरक्षी से जुड़ता है) की खोज करना वैक्सीन निर्माण का सबसे महत्वपूर्ण चरण है । मलेरिया वैक्सीन के लिए मीरोजोइट सतही प्रतिजन (Merozoite surface Antigen) MSP-4, MS-5 MS-2 सिहत अनेक विकल्पों पर अनुसंधान जारी है । प्लाज्मोडियम वाइवैक्स और प्लाज्योडियम फैल्मीपेरम के लिए मलेरिया वैक्सीन बनाने के लिए ऐडीनो वाइरस वैक्टर को लेकर अनुसंधान जारी है ।

मलेरिया वैक्सीन बनाने में समस्याएं-

- उपर्युक्त टारगेट ऐपीटोप का चुनाव
- प्लाज्मोडियम मानव शरीर में विभिन्न जीवन प्रावस्थाओं में पाया जाता है जैसे मिरोजोइट्स ट्रोफोजोइट इत्यादि इस तरह किसी प्रतिजन को लेकर बनाया गया वैक्सीन परजीवी की अन्य जीवन प्रावस्थाओं के प्रति अप्रभावी रहेगा ।
- प्लाज्मोडियम मानव के प्रतिरक्षा तंत्र को पर्याप्त धोखा देता है परजीवी की अनेक जातियाँ /
 स्ट्रेन (प्रभेद) का एक साथ संक्रमण होने से जटिलताएं बढ़ जाती है और वैक्सीन अन्य स्ट्रेन
 / जातियों के खिलाफ असफल हो सकती है ।

HIV वैक्सीन- इस दिशा में भी अनुसंधान जारी है किन्तु प्रमुख समस्या यह है कि HIV वायरस विस्तृत जीनी विविधता को दर्शाता है तथा इसमें तेजी से उत्परिवर्तन होते रहते हैं । जैसे HIV - M ग्रुप में 9 सबटाइप होते हैं । प्रत्येक सबटाइप परस्पर 30 प्रतिशत अन्तर रखते हैं जबिक एक ही सब टाइप के सदस्य 10 प्रतिशत तक भिन्न हो सकते हैं ऐसे में किसी एक सबटाइप के विरूद्ध बनाई गई वैक्सीन HIV के अन्य स्ट्रेन एवं सबटाइप्स के विरूद्ध असफल हो जाती है । प्रतिजन, प्रतिरक्षी अंतक्रिया में भाग लेने वाली प्रतिरक्षी HIV की gp120 कूट प्रोटीन से समानता रखती है यह मानव के प्रतिरक्षा तंत्र में व्यवधान डाल देती है और इस तरह मानव में एड्स के लक्षण उत्पन्न हो सकते है।

एड्स में टीबी, हिपेटाइटिस-बी', हरपीज सिम्प्लैक्स वायरस, हीमोफिलस इन्फ्लुऐंन्जा का भी सह-संक्रमण होता है । gp120 क्ट प्रोटीन में ऐसे कई अवयव है जो इन पैथोजन के साथ पुर्नयोजन कर सकते है । अत: अभी तक किसी सुरक्षित वैक्सीन का विकास नहीं हो पाया है ।

- प्लास्मोडियम फेलसीपेरम सतही प्रतिजन
- इन्फ्लुऐंन्जा वाइरस क्ट प्रोटीन

- रेबीज वाइरस जी प्रोटीन
- हिपेटाइटिस B मेजर सतही प्रतिजन
- हरपीज सिमप्लैक्स ग्लाइको प्रोटीन
- एच.आइ.वी एन्वलप प्रोटीन

एवियन (बर्ड) फ्लू वैक्सीन:

इन्फ्जूएंजा वायरस स्ट्रेन HSN 1 बर्ड फ्लू का रोग कारक है यह रोग बर्ड (पिक्षयों) में ही फैलता है किन्तु चिन्ताजनक बात यह है कि यह वायरस उत्परिवर्तित होकर मानव में भी रोग फैलाना शुरू कर दे तो यह संक्रमण समस्या बन सकती है अतः इसके लिए HSNI जीनोम द्वारा कोड किए जाने वाले उपयुक्त ऐपीटोप की खोज की जा रही है । ऐपीटोप के लिए HS प्रोटीन की खोज की जा रही है ।

वर्तमान में वैक्सीन के लिए लैप्रोसी बैक्टीरिया परट्यूसिस बैक्टीरिया, नीस्सेरिया गोनोरोही (Neisseria gonorrohae) हिपेटाइटिस A,B सायटोमिगोला वायरस हरपीज, सिम्पलैक्स मलेरिया, इन्फ्लूऐंजा और HIV इत्यादि कई पैथोजनों पर अनुसंधान जारी है।

सजीव प्नर्योजित वैक्सीन

सर्वप्रथम एडवर्ड जेनर (Edward Jener) ने बताया कि वैक्सीनिया वायरस मानव शरीर पर कोई क्प्रभाव नहीं डालता लेकिन यह शरीर के प्रतिरक्षा तंत्र को स्मॉल पॉक्स (Small pox) वायरस के विरूद्ध प्रेरित कर देता है । इस तरह वैक्सीनिया वायरस का प्रयोग स्मॉल पॉक्स के विरूद्ध वैक्सीन की तरह किया जाने लगा । वैक्सीनिया शब्द के व्यापक उपयोग से वैक्सीन शब्द प्रचलन में आया है सैक्हेरोपॉलीस्पोरा इरिथ्री (Saccharopolyspora erithreae) जो कि एक एक्टिनोमायसिटिज है यह इरिथ्रोमायसिन एण्टिबायोटिक (प्रतिजैविक) का वृहद उत्पादन करने में प्रयुक्त होती है जो मायकोप्लाज्मा यूरिओप्लाज्मा के विरूद्ध प्रभावी है । प्रतिजैविक की मॉलिक्यूलर फार्मिग ई. कोलाई, स्ट्रेप्टोमायसीन नॉरसेई इत्यादि पोषी कोशिकाओं में करवाई जाती है । कॉस्मिड (cosmid) pkc 505 प्लाज्मिड इत्यादि कई वैक्टर इस हेत् प्रयुक्त किए गए है ।वर्तमान अन्संधान CD8F + Tc - कोशिका अनुक्रिया की क्रियाविधी समझने पर केन्द्रित है । पूर्नयोजी वैक्सीन से आशय ऐसी वैक्सीन से है जो एक से अधिक बीमारियों के खिलाफ सुरक्षा दे सके । आज शिश्ओं को अनेक तरह की बीमारियों से बचाने लिए कई-कई वैक्सीन दी जाती है । यदि पूर्नयोजी वैक्सीन को प्रयोग में लाया जाए तो एक ही वैक्सीन अनेक बीमारियों के खिलाफ स्रक्षा दे सकेगी जिससे समय धन और लागत की बचत भी हो सकेगी । ऐसी वैक्सीन को ब्रॉड स्पैक्ट्रम वैक्सीन कहा जाता है । (ब्रॉड= Broad =विस्तृत, स्पैक्ट्रम Spectrum= रेंज =क्षेत्र) । यह सर्व विदित है कि वैक्सीनिया वायरस स्मॉल पॉक्स के विरूद्ध प्रतिरक्षा देता है और हिपेटाइटिस बी' मुख्य सतही प्रतिरक्षी हिपेटाइटिस बी' के विरूद्ध प्रतिरक्षा देता है । यदि वैक्सीनिया वायरस के जीनोम मे उक्त सतही प्रतिरक्षी जीन को इस तरह जोड़ दिया जाए कि इसका भी प्रभाव पूर्ण जीन एक्सप्रेशन हो सके तो यह जीनोम दोनो बीमारियों के लिए वैक्सीन की तरह काम करेगा । इसी सिद्धान्त पर आधारित अन्य वैक्सीन के लिए भी सोचा जा सकता है । यहाँ विषाण् विज्ञान के विस्तृत अध्ययन की भी प्रबल आवश्यकता है क्योंकि ऐसे मुद्दे बायोऐथिक्स (नैतिकता) का विषय है । पर्यावरण में ऐसी नयी वृहद क्षेत्र वैक्सीन को लाने से पहले यह सुनिश्चित कर लेना होगा कि कहीं इनके साथ कोई दुष्परिणाम तो नहीं आएंगे । हो सकता है कि ऐसी वैक्सीन ऐसे जीवों के खिलाफ भी कार्य करे जो हमारा लक्ष्य कदापि न हो और हमें उनके लिए फिर असहाय होकर अफसोस करना पड़े । यह भी संभव है कि इस तरह की पुर्नयोजी वैक्सीन अन्य वायरस के सम्पर्क में आकर ऐसे अनोखे वाइरस को जन्म दे जो जैव सम्पदा के लिए महाविनाशकारी हो ऐसे ही वायरस जैवहथियार (बायोवेपन्स) की तरह प्रयुक्त हो सकते है ।

14.2 प्रतिजैविक :

प्रतिजैविक व्यापारिक महत्व के ऐसे पदार्थ है जो मानव और अन्य जन्तुओं में विभिन्न संक्रामक रागों के इलाज में प्रयुक्त होते है । प्रतिजैविक वाइरस और वाइरस जिनत बीमारियों के खिलाफ बेअसर है । अब तक हजारों प्रतिजैविक खोजे जा चुके हैं ।जिनमें से लगभग 273 बैक्टीरिया(जीवाणु) द्वारा उत्पादित किए जाते हैं । मल्टीरेजिस्टैण्ट पैथोजन (बहु-प्रतिरोधी-रोगकारक) जैसे मायकोबैक्टीरियम इत्यादि के लिए काफी मात्रा में और नवीन प्रतिजैविक खोजे जाने की आवश्यकता है । बैक्टीरिया में प्रतिजैविक के उत्पादन के लिए कई जीन जिम्मेदार होती है इस आनुवांशिकी को समझ कर आनुवांशिकी इंजीनियरिंग द्वारा अधिक मात्रा में प्रतिजैविक का उत्पादन किया जा सकता है कोशिका में प्रतिजैविक का जैव संश्लेषण किस प्रक्रिया से होता है और किन कारणों से यह प्रक्रम प्रेरित / अवमंदित होता है यह जानकारी प्रतिजैविक के उत्पादन को दूद गित दे सकेगी।

एण्टीबायोटिक (प्रतिजैविक) का उत्पादन करने वाली जीन को वेक्टर DNA के साथ जोड़ कर इसे किसी हॉस्ट (पोषी) कोशिका में स्थानान्तरित किया जाता है । PEG (पोलीएथिलीन ग्लायकोल) के द्वारा ट्रांसफैक्शन प्रक्रिया को सुगम बनाया जा सकता है । वांछित प्रतिजैविक का एक्सप्रैशन होने के बाद इसे शुद्ध अवस्था में प्राप्त कर लिया जाता है । इसकी सक्रियता जाँचने के बाद यह उपयोग में लिए जाने के लिए तैयार होता है । अधिक उत्पादन के लिए हाई काँपी प्लाज्मिड लिया जा सकता है । जीन क्लोनिंग के लिए जीन के साथ प्रमोटर सीक्वेंस जोड़ी जा सकती है । इन्ड्यूसर मॉलिक्यूल, अनुकूल परिस्थितियाँ और उपर्युक्त कोशिका के साथ लिया जा सकता है । ऐण्टीबायोटिक्स का इस तरह उत्पादन आणविक खेती (मॉलिक्यूलर फार्मिंग) कहलाता है ।

स्ट्रेप्टोमायसीज नॉरसेई (Streptomyces noursei) से निस्टेटिन प्रतिरक्षी को कूट करने वाली जीन को क्लोन किया गया है । प्यूरोमायसिन (Puromycin) एवरमेक्टिन(Avermectin) प्रतिरक्षी प्रतिजैविकों के उन्नत उत्पादन के लिए निम्न तकनीकों को प्रयुक्त किया जाता है

- + जीवद्रव्य संलयन (Protoplast Fusion)
- + पुनर्योजित DNA तकनीक RDT=(Recombinant DNA Technology)
- + निर्देशित उत्परिवर्तन (Directed Mutation)
- + प्रभेद उन्नित (Strain Improvement)

प्रतिजैविकों का संश्लेषण करने वाली विविध जीनों के गठजोड़ से ऐसे नए प्रतिजैविक भी बनाए जा सकते है जो सामान्य तौर पर पर्यावरण में पाए ही न जाते हो वस्तुतः रोग जनक (Pathogenic) जीवाणुओं (Bacteria) में बढ़ते औषधी के प्रति प्रतिरोध के कारण नित नएं उन्नत प्रतिजैविकों की महती आवश्यकता है । जीव द्रव्य संलयन विधि द्वारा अनेक प्रतिजैविकों का एक साथ उत्पादन करने वाली नवीन कोशिका बनाई जा सकती है । ऐसी कोशिका में RDT (Recombinant DNA Technology) द्वारा प्रतिजैविक बनाने वाली अन्य किसी जीन को भी निवेशित किया जा सकता है । प्रतिजैविक वास्तव में रोगकारक के किसी क्रियाकलाप को अवरूद्ध कर देते है जिससे उनकी वृद्धि /गुणन / जीवन कम अथवा समाप्त हो जाता है कुछ रोग कारक ऐसे में उत्परिवर्तित, होकर उन क्रिया कलापों को सम्पन्न करने के लिए नया विकल्प तलाश लेते है और प्रतिजैविक उन पर बेअसर हो जाता है यही औषधी के प्रति प्रतिरोध हैं ।

14.3 प्रतिजन और प्रतिरक्षी

सामान्यतः ऐसे पदार्थ जो विशिष्ट इम्यून प्रतिक्रिया को प्रेरित करते है उन्हें प्रतिजन कहते है वस्तुतः इन्हें इम्यूनोजन कहना अधिक उपयुक्त होगा क्योंकि ऐसे समस्त मॉलिक्यूलर जिनमें इम्यूनोजेनिसिटी पाई जाती है वे सभी प्रतिजन तो होते है किन्तु समस्त एण्टीजन (प्रतिजन) इम्यूनोजेमिक भी हों यह जरूरी नहीं जैसे हैप्टेन जो प्रतिजन होने के बावजूद विशिष्ट इम्यून प्रतिक्रिया प्रेरित नहीं करते हैं।

प्रतिजन का आणविक भार लगभग एक लाख डाल्टन (100,000 Da) होता है प्रतिजन सामान्यता जैवरासायनिक रूप से प्रोटीन होते है ऐपीटोप प्रतिजन के वे विशिष्ट भाग है । जो इम्यूनोजेनिकली (Immunogenically) सक्रिय होते है, और लिम्फोसाइट / प्रतिरक्षी से अन्तक्रिया (Binding) करते है ।

चिकित्सीय महत्व के एण्टीजन (प्रतिजन) का जीन क्लोंनिंग द्वारा उत्पादन किया जा सकता है क्योंकि प्रतिरक्षा तंत्र सिस्टम इन प्रतिजन के विरूद्ध ऐण्टीबॉडी (प्रतिरक्षी) तैयार करता है । अतः इन प्रतिजन का प्रयोग वैक्सीन की तरह भी किया जा सकता है । ऐपीटोप की सिक्वेंसिंग द्वारा वाँछित पेप्टाइड का संश्लेषण जैव प्रोद्यौगिकी द्वारा किया जा सकता है । विभिन्न वायरस क्ट प्रोटीन (Viral coat Protein) सतही प्रतिजन और ट्यूमर कोशिका सरफेस ऐण्टीजन (अब्रुद कोशिका सतही प्रतिजन) का संश्लेषण उन्हें कोड करने वाली जीन की क्लोनिंग / पूर्नयोजी परम से किया जा सकता है । क्योंकि प्रतिरक्षी (ऐण्टीबॉडी) विशिष्टता के साथ प्रतिजन के ऐपीटोप से बंधित (Bind) होते है । अतः ऐसे प्रतिजन को अन्य प्रोटीन के मिश्रण / समूह में भी आसानी से पहचाना जा सकता है । औषधी के अणु को किसी वांछित लक्ष्य (कोशिका / प्रतिजन) पर भी इस तरह निर्देशित किया जा सकता है कि यह किसी अन्य कोशिका को प्रभावित न करे ।

आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा हायब्रिडोमा कोशिकाएं बनाई जाती है जो प्रतिरक्षी का उत्पादन कर सकती है। ऐसे प्रतिरक्षी, बीमारियों के निदान में प्रयुक्त होते है। HPV (ह्यूमन पैपीलोमा वायरस) की कैप्सिड प्रोटीन का यीस्ट कोशिका में पुर्नयोजी DNA टैक्मोलोजी द्वारा उत्पादन कराया गया है इन प्रोटीनों को इस वायरस के खिलाफ प्रयुक्त वैक्सीन में प्रयुक्त किया जा रहा हैं । HPV गर्भाशय कैंसर पैदा करता है इस तरह यह वैक्सीन गर्भाशय कैंसर (Cervical cancer)से बचाव करती है ।

B-लिम्फोसाइट के जीनोमिक DNA से "इम्यूनोग्लोब्यूलिन वेरिएबल रीजन" जीन को प्राप्त कर उपयुक्त वाहक जैसे (बैक्टीरियोफेज) में इन जीन को अभिव्यक्त कराया जा सकता है।

हिपेटाइटीस बी' वायरस लिवर केंसर पैदा करता है। इसकी सतही प्रोटीन HBs Ag को ई.कोलाई में अभिव्यक्त कराया गया है। जो वैक्सीन बनाने में उपयोगी है। अतः ऐसी वैक्सीन लिवर कैंसर से सुरक्षा देती है।

M2A प्रतिजन; लिम्फेटिक एण्डोथीलियल कोशिका मार्कर है । जो ऑनकोफेटल (oncofetal) प्रकृति का है । यह सामान्यतया ट्यूमर ऊतक में लिस्फेटिक एण्डोथीलियल कोशिका में अभिव्यक्त होता है इसके लिए D2-40 मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी तैयार की गयी है ।

वैक्यूलोवायरस कैसट वैक्टर PAC-K-Fc का प्रयोग कीट कोशिकाओं मे ह्यूमन काइमोरिन के उत्पादन में किया गया है । प्रतिरक्षी की भारी और हल्की श्रृंखला की क्लोनिंग के लिए PAC UWSI से व्युत्पन्न वाहक उपयुक्त पाए गए है।

मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी और प्रतिरक्षी प्रौधोगिकी के लाभ - यह अत्यन्त शुद्ध प्रतिरक्षी अभिकर्मक होते है इन्हें विशिष्ट रूप से किसी एक ऐपीटोप के लिए भी विकसित किया जा सकता है । उपयुक्त स्क्रीनिंग द्वारा मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी चयनित किए जा सकते है इसके साथ ही आवश्यकतानुसार मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी उत्पादित किए जा सकते है । प्रतिरक्षी के उत्पादन से कई उपचार पेटिका (Diagonstic kit) बनाई गई है जो प्रोटीन / हार्मोन से विशिष्टता के साथ वांछित होती है इस तरह प्रतिदर्श की जाँच कर रोग / गर्भावस्था इत्यादि का पता लगाया जा सकता है । प्रैगनेंसी टेस्ट किट मूत्र में हार्मोन की उपस्थित का पता लगा कर गर्भावस्था की जानकारी देती है।

14.4 एन्जाइम :

एन्जाइम जैव उत्प्रेरक है जो रासायनिक अभिक्रियाओं को उत्प्रेरित करते है इनका उपयोग खाद्य उद्योग, माँस उद्योग चर्म उद्योग ओर डिर्टजेंट उद्योग में बडी मात्रा में किया जा रहा हैं।

एन्जाइम का उत्पादन - एन्जाइम के उत्पादन के लिए जन्तु कोशिका पादप कोशिका सूक्ष्मजीव यीस्ट और लवण इत्यादि को प्रयुक्त किया जा रहा है । आदर्श परिस्थितियों / संवर्धन माध्यम द्वारा एन्जाइम का वृहद उत्पादन संभव है ।

एन्जाइम को कूट करने वाली जीन को उपयुक्त अभिव्यक्त वाहक द्वारा साफ किया जा सकता है इस तरह आदर्श पोषी कोशिका में एन्जाइम का वृहद उत्पादन संभव हो जाता है। जो प्राकृतिक अवस्था में बहुत कम उत्पादित होते है।

जीन क्लोनिंग द्वारा जायलेज एंजाइम को एसपरजिलस में उत्पादित कराया गया है। इसी तरह काइमोसिन एन्जाइम को यीस्ट कोशिका में क्लोनिंग द्वारा यूरोकाइनेज एन्जाइम का उत्पादन कराया जाता है जो रक्त के थक्के को घोलने में सहायक है और चिकित्सा के क्षेत्र में प्रयुक्त होता है। जीन क्लोनिंग द्वारा ई. कोलाई में फॉस्फेटायडिलसेरिन सिंथेज एन्जाइम का

बहुत अधिक उत्पादन कराया जा चुका है। इसी प्रकार मैलेट डिहाइड्रोजिनेज जीन को हैलोफिलिक आर्कीबैक्टीरियम हैलोआर्कुला मारिसमोटुई से प्राप्त किया गया और इसकी सीक्वेंसिंग की गई इस एन्जाइम में 303 एमीनो ऐसिड होते है और इसका अणुभार 32638 Dalton पाया गया है। इस एन्जाइम को PET II वाहक द्वारा ई कोलाई में अक्रिय किया जाता है।

14.5 सारांश :

वैक्सीन ऐसे प्रतिजन होते हैं जो शरीर के प्रतिरक्षी तंत्र को संक्रमण के विरुद्ध प्रतिरक्षी बनाने के लिए प्रेरित करते हैं ।इनका निर्माण आनुवांशिक अभियांत्रिकी द्वारा किया जाता है । मलेरिया वैक्सीन के उत्पादन का कार्य अभी प्रगति पर है जिसमें की मीरोजोइट सतही प्रतिजन का उपयोग किया जाता है । एच.आई.वी. -वैक्सीन बनाने पर शोध कार्य चल रहा है । प्रतिरक्षी ऐसे पदार्थ होते हैं जो जीवाणुओं की वृद्धि रोकते हैं तथा उन्हें नष्ट कर देते हैं । प्रतिरक्षी का अधिक मात्रा में निर्माण आणविक खेती द्वारा किया जाता है । विभिन्न प्रकार के एन्जाइम का उत्पादन भी जीवाणुओं द्वारा किया जाता है । एन्जाइम जैव उत्प्रेरक होते है जो कि रासायनिक अभिक्रियाओं को प्रभावित करते हैं । इनका उपयोग खाद्य उद्योग, मांस उद्योग,चर्म उद्योग और डिटरजेंट उद्योग में बड़ी मात्रा में किया जाता है । मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी द्वारा विभिन्न प्रकार के निदान किट का निर्माण किया जाता है ।

14.6 शब्दावली:

वैक्सीन: वैक्सीन में ऐसे प्रतिजन होते है जो शरीर को इम्यून सिस्टम (प्रतिरक्षी तंत्र) को संक्रमण के विरूद्ध प्रतिरक्षी बनाने के लिए प्रेरित करते है किन्तु ये स्वयं संक्रमण नहीं करते है ।

रेस्ट्रिक्शन एण्डोन्यूक्लिऐज एन्जाइम -ऐसे एन्जाइम जो कि डी.एन.ए को विशिष्ट स्थानों से काटते हैं।

सजीव पुर्नर्योजित वैक्सीन- इस तरह वैक्सीनिया वायरस के प्रयोग से स्मॉल पॉक्स के विरूद्ध बनने वाली वैक्सीन को कहते हैं ।

प्रतिरक्षी- प्रतिजनों के प्रभाव से उत्पन्न होने वाले रासायनिक पदार्थ ।

14.7 संदर्भ ग्रंथ:

- TA Brown-Gene Cloning, DNA Analysis
- Molecular Biology of the gene-IV-Watson, Hopkins, Roberts, Steitz,
 Weiner
- Mitra, S. (1996) "Genetic Engineering- Principles and Practices.
 "Macmillan India Ltd. Delhi

14.8 बोध प्रश्न

- 1- वैक्सीन में निम्नांकित में से किसका संघटन पाया जाता है-
 - (अ) एंटीजन
- (ब) एंटीबॉडी
- (स) एंजाइम
- (द) एंटीबायोटिक
- 2- आनुवांशिकी अभियांत्रिकी द्वारा सर्वप्रथम बनाई गई सफल वैक्सीन है-

- (अ) मलेरिया के लिए (ब) DNA के लिए (स) हिपेटाइटिस-बी' के लिए
- (द) बर्ड फ्लू के लिए
- 3- एंजाइम रासायनिक साम्य पर क्या प्रभाव डालते है-
 - (अ) कोई प्रभाव नहीं डालते
- (ब) दॉइ और खिसका देते है
- (स) साम्य को बॉइ और खिसका देते है (द) उपरोक्त दोनो
- 4- एक आदर्श वैक्सीन में आप विशेषताऐ देखना चाहेंगे।
- 5- "पल्स पोलियो टीकाकरण अभियान" की भारत के कुछ राज्य मे असफलता के आप क्या संभावित कारण प्रस्तुत करना चाहेंगे, ।
- 6- एंटीबायोटिक (प्रतिजैविक) से आप क्या समझते है ।

14.9 अभ्यासार्थ प्रश्नः

- 1- पुर्नयोजी प्रोटीन के उत्पादन के लिए अभिव्यक्ति वाहक एवं पोषी कोशिका में क्या विशेषताएं होनी चाहिए।
- 2- प्राणीजैव प्रोद्योगिकी द्वारा प्रतिजैविकों के विकास पर एवं उपयोगिता पर प्रकाश डालिए ।

इकाई - 15

वृहद् मात्रा में प्राणी कोशिका संवर्धन । बायोरिएक्टर । बायोरिएक्टर का स्वनियंत्रण । कोशिका, ऊतक व अंगों की बैंकिंग ।

LARGE SCALE ANIMAL CELL CULTURE.
BIOREACTORS. AUTOMATION OF
BIOREACTORS. CELL, TISSUE AND ORGANS
BANKING.

इकाई की रुपरेखा

- 15.0 उद्देश्य
- 15.1 प्रस्तावना
- 15.2 वृहद मात्रा में प्राणी कोशिका संवर्धन
- 15.2.1 बायोरियक्टर
- 15.2.2 बायोरियक्टर की संरचना
- 15.2.3 बायोरियक्टर में कोशिका संवर्धन
- 15.2.4 बायोरियक्टर की स्वनियंत्रण प्रणाली
- 15.3 कोशिका ऊतक व अंगों की बैंकिंग
- 15.3.1 कोशिका बैंकिंग
- 15.3.2 वीर्य बैंकिंग
- 15.3.3 स्तम्भ कोशिका बैंकिंग
- 15.4 ऊतक बैंकिंग
- 15.4.1 त्वचा निर्माण व बैंकिंग
- 15.4.2 रक्त बैंकिंग
- 15.5 अंग बैंकिंग
- 15.5.1 अंग निर्माण व बैंकिंग
- 15.5.2 नेत्र बैंकिंग
- 15.6 सारांश
- 15.7 शब्दावली
- 15.8 संदर्भ ग्रंथ

15.0 **उद्देश्य**:

प्रस्तुत इकाई में जन्तु कोशिकाओं के वृहद् मात्रा में उत्पादन तथा उत्पादन में काम आने वाले संयंत्रों का विवरण है। वृहद् पैमाने पर कोशिका का संवर्धन बायोरिएक्टर द्वारा किया जाता है। इन बायोरिएक्टर द्वारा कम समय में अधिक मात्रा में कोशिका संवर्धन किया जा सकता है। ऊतक व अंगों को अधिक समय तक सुरक्षित रखने के लिए शीत परिरक्षण विधि उपयोग में ली जाती है। कोशिका रेखा बैंकिंग का उपयोग रोग निदान में किया जाता है। सीमन बैंकिंग का उपयोग शुक्राणुओं के सुरक्षित संग्रहण व वितरण के लिए किया जाता है। बायोरिएक्टर द्वारा वृहद मात्रा में कोशिका उत्पादन के विभिन्न आयामों का अध्ययन इस इकाई में करेंगे। कोशिका, ऊतक व अंगों की बैंकिंग तथा त्वचा, रक्त व नेत्र बैंकिंग आदि के उपयोग का अध्ययन भी इस इकाई का उद्देश्य है।

15.1 प्रस्तावनाः

कोशिका संवर्धन तकनीकी द्वारा न केवल कोशिकाओं को शरीर से बाहर संवर्धित माध्यम में रखकर अध्ययन की सुविधा मिलती है वरन् इन कोशिकाओं के औषधीय महत्व के पदार्थों के उत्पादन जैसे टीका (Vaccine) आदि का वृहद मात्रा में उत्पादन किया जा सकता है । पूर्व की इकाई में हम कोशिका संवर्धन की तकनीकियों व कार्य में आने वाले उपकरणों के बारे में जानकारी दी जा चुकी है । इस इकाई में जन्तु कोशिकाओं के वृहद मात्रा में उत्पादन तथा वे संयंत्र जिनमें इनका उत्पादन किया जाता है तथा उनका स्वनियंत्रण का अध्ययन करेंगे ।

आवश्यकता पड़ने पर चिकित्सकीय व औद्योगिक उत्पादन हेतु कोशिका, ऊतक, अंगों की उपलब्धता हेतु कुछ युक्तियां विकसित की जा रही है । जिनके द्वारा इन्हें (क्रायोप्रिजर्व) शीतपरिरक्षित कर उपलब्ध कराई जा सकेंगी । शुक्राणु व भ्रूण शीत के परीरक्षण के बारे में तथा कृत्रिम गर्भाधान के समय इनके उपयोग की महत्वता से हम परिचित है ।

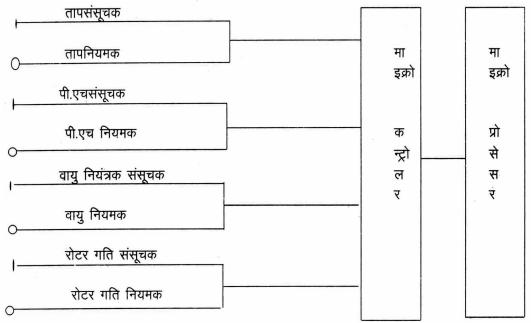
15.2 वृहद मात्रा में कोशिका संवर्धन:

15.2.1 बायोरियेक्टर - जन्तु कोशिकाओं के वृहद् मात्रा में संवर्धन व उत्पादन हेतु प्रयोग में लाये जाने वाले उपकरण को बायोरियेक्टर कहते है । बायोरियेक्टर की संकल्पना मूल रूप से किण्वन औद्योगिकी से संबंधित है । जिसमें सूक्ष्म जीवाणुओं का विशिष्ट रूप से बनाये गये बड़े आकार के बर्तनों में संवर्धित माध्यम में किण्वनकारी पदार्थों के उत्पादन हेतु कार्य में लाया जाता है जिन्हें फर्मेन्टर कहते है । बायोरियेक्टर जिनमें वृहद् मात्रा में कोशिका संवर्धन किया जाता है । उसकी मूलभूत संरचना फर्मेन्टर जैसी ही होती है ।

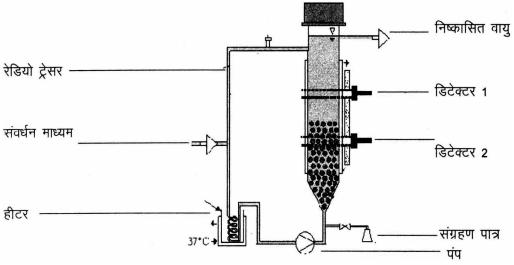
15.2.2 **बायोरिएक्टर की संरचना** - किसी भी बायोरियेक्टर की संरचना में निम्न की आवश्यकता होती है ।

- 1. वह टैंक जिसमें कोशिका संवर्धन किया जाता है । लंबे समय तक निर्जर्मीकृत रह सके ।
- 2. इसमें संवर्धन हेतु उपयोगी गैसों की मात्रा की सप्लाई आवश्यकतानुसार रखी जा सके ।

- 3. कोशिकायें द्रव माध्यम में एक दूसरे से टकराये बिना तथा संवर्धन टैंक के पेंद्रे में एकत्रित होऐ बिना निरन्तर तैरती रहे ।
- 4. तापक्रम नियंत्रण की सम्चित व्यवस्था।
- 5. पी.एच. नियंत्रण की सम्चित व्यवस्था।
- 6. बीच-बीच में संवर्धन नियंत्रण हेतु सेम्पल लेने की व्यवस्था ।



चित्र 15.1 बायोरिएक्टर की स्वतंत्रण प्रणाली



चित्र 15.2 बायोरिएक्टर का रेखाचित्र

उपरोक्त चित्र में एक लम्बवत् आकार का टैंक है। जिसमें एक छड़ के अपने अक्ष पर घूर्णन से टैंक में स्थित संवर्धन माध्यम लगातार गतिशील रहता है। इसमें तीन नलिकायें जुड़ी होती है। ऊपरी सिरे पर एसेप्टिक इनोकुलेशन पाइप होता है तथा नीचे एक सेम्पलिंग पोइंट व एक ड्रेन पाइप होता है। निचले सिरे पर ही एक एयर लाइन होती है। जिससे कि माध्यम को

वायवीय बनाया जाता है । उपरोक्त लक्षण एक (नॉन आटोमेटेड) अस्वचालित बायोरियेक्टर के है । स्वचालित रियेक्टर में विभिन्न कार्यप्रणालियों के नियंत्रण हेतु सेन्सरस् लगे हुए होते है जो कि संवर्धन माध्यम के पी. एच., तापक्रम तथा वायु की मात्रा उसके घटकों आदि का नियंत्रण करते है।

15.2.3 बायोरियक्टर में कोशिका संवर्धन - निर्जर्मीकृत इनोकुलम पाइप को सर्वप्रथम उचित संवर्धन के माध्यम भर दिया जाता है । तत्पश्चात् वे कोशिकायें जिनका निलम्बन संवर्धन (Suspended Culture) किया जाता है, को एक निश्चित अनुपात में टैंक में भर दिया जाता है । इसके पश्चात् रोटर को एक निश्चित घूर्णन गित द्वारा चलाकर माध्यम व कोशिकाओं को घूर्णन गित प्रदान की जाती है । निर्जर्मीकृत वायु पाइप द्वारा ऑक्सीजन कार्बन डाई ऑक्साइड को एक निश्चित अनुपात में प्रवाहित किया जाता है । सेम्पिलंग ट्यूब के द्वारा समय-समय पर संवर्धित माध्यम में स्थित कोशिकाओं की मात्रा व उत्पादों का अध्ययन किया जाता है ।(चित्र व 15.2)

15.2.4 बायोरियक्टर की स्वनियंत्रण प्रणाली- वर्तमान में कोशिका एवं कोशिकीय पदार्थी के संवर्धन माध्यम में उत्पादन हेतु स्वनियंत्रण प्रणाली युक्त बायोरियेक्टर उपयोग में लिये जाते हैं । तापक्रम, पी.एच., ऑक्सीजन तथा विशिष्ट कोशिका उत्पाद की मात्रा जात करने हेतु उनके विशिष्ट सेन्सर बायोरियेक्टर की आन्तरिक सतह पर लगे रहते हैं । एक सूक्ष्म कन्ट्रोलर द्वारा इन सेन्सर के द्वारा प्राप्त सूचनाओं को माइक्रो प्रोसेसर में प्रेषित किया जाता है । माइक्रोप्रोसेसर में पूर्व निर्धारित कम्प्यूटर प्रोग्राम निहित होते हैं । उदाहरणार्थ संवर्धन का तापक्रम यदि 37°C निर्धारित होता है तो तापक्रम संवेदी यंत्र माइक्रोप्रोसेसर को इसकी जानकारी प्रदान करता है तथा क्लिंग व हीटिंग उपकरणों (डिवाइस) द्वारा वैसल के आन्तरिक तापक्रम का स्वनियंत्रण किया जाता है । इसी प्रकार से वायवीय घटकों, पी.एच., कोशिका व उत्पादों की मात्रा आदि का नियंत्रण किया जाता है । (चित्र 15.1)

15.3 कोशिका ऊतक व अंगों की बैंकिंग:

कोशिकीय ऊतक व अंगों का चिकित्सीय महत्व तथा पशु प्रजनन में उपयोग के कारण इन्हें शीत परिरक्षण के द्वारा भविष्य के उपयोग हेतु रखे जाने की प्रक्रिया को कोशिका ऊतक व अंग बैंकिंग कहते है ।

15.3.1 कोशिका बैंकिंग (Cell Banking) -विभिन्न प्रकार की कोशिका रेखा जो कि विभिन्न चिकित्सीय diagonstic जांच हेतु कार्य में लाई जाती है। ये निरन्तर संवर्धन माध्यम में जीवित रहती है तथा मोनोलेयर संवर्धन के रूप में भी लंबे समय तक उन्हें जीवित रखा जा सकता है। आवश्यकता पड़ने पर इन कोशिका संवर्धन बैंकों से कोशिकाओं की का वितरण किया जाता है। 15.3.2 वीर्य बैंकिंग - पशुपालन विभाग विभिन्न अच्छी नस्लों के शुक्राणुओं को एक निश्चित प्रक्रिया के पश्चात् स्ट्रा में शीतपरिरक्षित करके द्रव नाइट्रोजन में अवशीतन तथा संग्रहित करके रख लेते है जिन्हें आवश्यकता पड़ने पर प्रजनन इकाईयों को प्रेषित करके इनकी सहायता से मादा पशु में गर्भाधान कराया जाता है। शुक्राणुओं के अवशीतन की जो सबसे प्रमुख समस्या यह है कि शुक्राणु कोशिका में स्थित जल क्रिस्टलीकरण द्वारा जब ठोस अवस्था में आता है तो बर्फ बन जाने के कारण बर्फ का आकार उसके द्रव आकार से अधिक होने के कारण कोशिका को फाड़ देता

है । अतः शुक्राणुओं के अवशीतन से पूर्व उसमें स्थित जलीय घटकों को क्रमिक चरणों में गिलसरोल से प्रतिस्थापित किया जाता है अर्थात् शुक्राणु कोशिका में पानी के अणुओं के स्थान पर गिलसरोल के अणु प्रतिस्थापित हो जाते है । जिनका जमाव बिन्दु जल के अणुओं की तुलना में काफी अधिक होता है । इस स्थिति में शुक्राणु को निलका में द्रव नाइट्रोजन में भरकर अवशीतलन कर लिया जाता है । ये सुरक्षित शुक्राणु, शुक्राणु बैंक से आवश्यकतानुसार वितरित किये जाते है ।

15.3.3 स्तंभ कोशिका बैकिंग - स्तम्भ कोशिकाओं की परिवर्धन क्षमता विभेदित वयस्क कोशिकाओं से अधिक होती है । कुछ घातक रोगों जैसे शिशुओं में होने वाला कैंसर है जिसमें रेडियोथैरेपी या कीमोथैरेपी द्वारा लाभदायक कोशिकाओं की मृत्यु हो जाती है । ऐसे शिशुओं को रक्त कैंसर के पश्चात् यदि संवर्धित की गई अपरा से प्राप्त स्तम्भ कोशिका जिन्हें अवशीतलन द्वारा स्तंभ कोशिका बैंक में परिरक्षित कर सुरक्षित रख लिया जाता है, इनको यदि शिशु की अस्थिमज्जा में प्रतिरोपित किया जाये तो वह मज्जा कोशिकाओं की तरह ही कार्य करती है । अपरा से प्राप्त स्तम्भ कोशिकाओं की बैंकिंग से तथा उनके शीत परिरक्षण पर अत्यधिक शोधकार्य चल रहे है तथा आने वाले समय में ल्यूकेमिया, एनीमिया, सिकलसैल एनीमिया व प्रतिरक्षा तंत्र की कमजोरी जैसे रोगों के लिये यह अत्यधिक लाभकारी तकनीक साबित होगी ।

15.4 ऊतक बैकिंग:

15.4.1 त्वचा निर्माण व बैंकिंग - सन् 1979 में वैज्ञानिक एच. ग्रीन व सहयोगियों ने अपने प्रयोगों द्वारा दर्शाया कि संवर्धन माध्यम में विभेदीकरण के पश्चात् त्वचा का निर्माण करती है । जलने या घाव होने की स्थिति में कई बार जले हुए स्थान पर शरीर के किसी हिस्से के त्वचा काट कर उसका प्रत्यारोपण कर व्यक्ति का इलाज किया जाता है । परन्तु कई बार अधिक जल जाने की स्थिति में या प्रत्यारोपित त्वचा के अवरोधन की स्थिति में त्वचा की आवश्यकता पड़ती है । यदि हम अपनी त्वचा का संवर्धन कर उसके विभेदीकरण द्वारा त्वचा लगकर उसे अवशीतन कर बैंकिंग द्वारा सुरक्षित रख सके तो आवश्यकता पड़ने पर त्वचा बैंक त्वचा उपलब्ध करा सकता है । व्यक्ति विशेष की स्वयं की त्वचा यदि त्वचा बैंक से प्राप्त होती है तो शरीर द्वारा उसे अवरोध करने की समस्या भी नहीं रहती है । भारत में पूना में स्थित केन्द्रीय कोशिका विज्ञान केन्द्र इस क्षेत्र के अग्रणी है । निरन्तर उत्तक बैंकों में त्वचा या अन्य उत्तकों के परिरक्षण तथा आवश्यकता पड़ने पर उसे रोगी को प्रदान करने पर आपातकालीन स्थिति का सामना किया जा सकता है ।

15.4.2 रक्त बैंकिंग - रक्त बैंक अस्पताल का वह स्थान होता है जहाँ पर कि रक्त दाता से रक्त प्राप्त कर उसे सुरक्षित रख आवश्यकता पड़ने पर किसी जरूरतमंद को प्रदान किया जाता है । रक्त प्राप्त करने हेतु रक्तदाता के स्वास्थ्य का उचित परीक्षण किया जाता है तथा एक बार में एक रक्त दाता से 500 एम.एल रक्त लिया जाता है । सामान्यतया 1 से 6°C तापक्रम पर रक्त पैंतीस दिन तक खराब नहीं होता है । कुछ रक्त बैंक के विभिन्न भागों को अलग-अलग करके विभिन्न अवशीतन विधियों द्वारा लंबे समय तक के लिये परिरक्षित कर आवश्यकतानुसार जरूरतमंद व्यक्तियों को रक्त या रक्त के विशेष भागों को उपलब्ध कराते है । रक्त एक संयोजी ऊतक है तथा इसकी बैंकिंग को रक्त बैंकिंग के अन्तर्गत अध्ययन किया जाता है ।

15.5 अंग बैकिंग:

15.5.1 अंग निर्माण एवं बैकिंग - परिवर्धनात्मक जैविकी के विभिन्न अनुसंधानों से अंगों के निर्माण की प्रक्रिया की गुत्थियां धीरे-धीरे सुलझती जा रही है । कौन सी जीन किस अंग के निर्माण में काम आती है । उसकी नवीनतम जानकारियां प्राप्त हो रही है । उदाहरणार्थ हॉक्स जीनों का समूह पादिवन्यास निर्माण के उपयोग में आता है । इसी प्रकार विभिन्न अंगों की प्रोजेनिटर कोशिकाओं की प्लूरीपोटेंट क्षमताओं के अध्ययन के पश्चात् उनसे अंग निर्माण किया जा सकता है । वैज्ञानिक इस क्षेत्र में हड्डियों के जोड़, अग्नाशय, यकृत आदि के बनाने के प्रयास कर रहे है तथा कुछ में सफलता भी प्राप्त की जा चुकी है । इन अंगों का संवर्धन माध्यम में निर्माण के पश्चात् बैकिंग कर जिस व्यक्ति को उसके नष्ट हुए अंग की आवश्यकता होती है । उनमें प्रत्यारोपित किया जा सकता है । अंग बैकिंग क्षेत्र अभी भी अपने शैशवकाल में है परन्तु प्राणी जैव प्रौद्योगिकी एवं परिवर्धनात्मक जैविकी क्षेत्र में चल रहे विभिन्न वैज्ञानिक शोधों से यह संभावना प्रबल होती जा रही है कि भविष्य में मनुष्य अपनी कोशिकाओं से ही स्वयं के अंगों का निर्माण कर अंग बैंकों में परिरक्षित कर सकेगा तथा उसके अंगों के क्षतिग्रस्त होने की स्थिति में अंग बैंकों से स्वयं की कोशिकाओं से निर्मित स्वस्थ अंगों को प्रत्यारोपित कर सकेगा ।

15.5.2 नेत्र बैंकिंग - कार्निया जिनत अंधापन नेत्र रोग का एक प्रमुख कारण है । यदि इस प्रकार के नेत्र रोगियों मे कॉर्निया का प्रत्यारोपण कर दिया जाये तो प्रत्यारोपण की सफलता उच्च होती है । निरन्तर सूचना पत्रों व दूरदर्शन द्वारा इस प्रकार की सूचना प्रसारित की जा सकती है कि आपके द्वारा दान किये गये नेत्र किसी को रोशनी दे सकते है । नेत्र बैंक से अभिप्राय है कि किसी चिकित्सालय में नेत्र दान दाता द्वारा दिये गये नेत्र को सुरक्षित रख संबंधित नेत्र ऊतक को आवश्यकता पड़ने पर प्रत्यारोपण हेतु प्रदान कर दिया जाये । अधिकांशतः कॉर्निया संग्रहण केन्द्र जिन्हें नेत्रदान केन्द्र भी कहते है । वे नेत्र दाता की मृत्यु के पश्चात् नेत्र को संवर्धित माध्यम में रखकर शीघ्र जरूरतमंद व्यक्ति को कुशल चिकित्सकों की देख रेख में शल्य चिकित्सा द्वारा प्रत्यारोपित कर दिया जाता है । प्रत्यारोपण से पहले रक्त दाता के रक्त के नमूने प्राप्त किये जाते है । जिनका परीक्षण कर संक्रामक रोग जैसे एच.आई.वी., हिपेटाइटिस बी एवं सी, रक्त समूह आदि की जांच कर ली जाती है । ऑप्टीसोल जी.एस नाम का संवर्धित माध्यम कार्निया ऊतक को चौदह दिन तक अवशीतन अवस्था में जीवित रख सकता है।

15.6 सारांश :

बायोरिएक्टर जोकि वृहद मात्रा में कोशिका संवर्धन के काम आता है इसकी संरचना फर्मेटर जैसी ही होती है ।कोशिका के संवर्धन माध्यम में उत्पादन हेतु स्वनियंत्रण प्रणाली युक्त बायोरिएक्टर उपयोग में लिए जाते है जिसमें तापक्रम, पी.एच., ऑक्सीजन तथा विशिष्ट कोशिका उत्पादों की मात्रा ज्ञान करने हेतु सेंसर लगे रहते है । जिसका नियंत्रण कम्प्यूटर द्वारा किया जाता है । कोशिका, ऊतकों व अंगों की बैंकिंग इनके संरक्षण व वितरण के लिए की जाती है ।कोशिकीय ऊतक व अंगों का चिकित्सीय महत्व तथा पशु प्रजनन में उपयोग के कारण इन्हें शीत परिरक्षण के द्वारा भविष्य के उपयोग हेतु रखे जाने की प्रक्रिया को कोशिका ऊतक व अंगों की बैंकिंग के निम्न प्रकार होते है- कोशिका बैंकिंग, वीर्य

बैंकिंग, स्तम्भ कोशिका बैंकिंग,ऊतक बैंकिंग के अर्न्तगत त्वचा निर्माण व बैंकिंग तथा रक्त बैंकिंग होती है।

15.7 शब्दावली :

बायोरियेक्टर - जन्तु कोशिकाओं के वृहद् मात्रा में संवर्धन व उत्पादन हेतु प्रयोग में लाये जाने वाले उपकरण को बायोरियेक्टर कहते है ।

कोशिका बैकिंग (Cell Banking) - विभिन्न प्रकार की कोशिका रेखा जो कि विभिन्न चिकित्सीय diagnostic जांच हेत् कार्य में लाई जाती है।

सेम्पिलंग ट्यूब सेम्पिलंग ट्यूब के द्वारा समय-समय पर संवर्धित माध्यम में स्थित कोशिकाओं की मात्रा व उत्पादों का अध्ययन किया जाता है।

रक्त बैंकिंग- रक्त बैंक अस्पताल का वह स्थान होता है जहाँ पर कि रक्त दाता से रक्त प्राप्त कर उसे सुरक्षित रख आवश्यकता पड़ने पर किसी जरूरतमंद को प्रदान किया जाता है।

15.8 संदर्भ ग्रन्थ:

- Freshney, R.I. (2005). "Animal cell culture: A Practical Approach".
 Oxford University Press Oxford.
- 2. Paul, J. (1975). "Cell and Tissue Culture (5th ed.) " Livingstone, Edinburgh. U.K.
- 3. Bulock, J.D and Kristiansen, B. (eds.) 1987. "Basic Biotechnology". Academic Press, New York.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J (2003). "Molecular Biotechnology-Principles and Applications of Recombination DNA (3rd ed.)" ASM Press, Washington, D.C.
- 5. Mitra, S. (19996) "Genetic Engineering- Principles and Practices." Macmillan India Ltd.Delhi.

15.9 बोध प्रश्न

1. कोशिकाओं का वृहद मात्रा में संवर्धन के लिए उपयोग में लिया जाता है

अ. बायोरिएक्टर

ब. होमोजिनाइजर

स. कोलोनी काउंटर

द. उपरोक्त सभी ।

2. सीमन बैंकिंग के अंतर्गत किसका परिरक्षणा किया जाता है?

अ. नेत्रों का

ब. अंगों का

स. ऊतकों का

द.श्क्राण्ओं का

- 3. स्टेम कोशिका किस प्रकार की होती है?
- अ. पूर्ण शक्त

ब. भूरी पोटेंट

स मल्टीपोटेंट

द. उपरोक्त सभी

स्टेम कोशिका बैंकिंग निम्न के लिए उपयोगी है।

- अ. प्रोटीन उत्पादन
- ब. कार्बोहाइड्रेट उत्पादन

स. वसा उत्पादन

द. आवश्यकता पडने पर उपयुक्त कोशिकाओं की उपलब्धता

हेतु ।

- 4. बायोरिएक्टर क्या है।
- 5. बायोरिएक्टर की प्रणाली का वर्णन करो ।
- 6. संक्षिप्त टिप्पणी लिखो
- अ. कोशिका लाइन बैकिंग

ब. सीमन बैंकिग

स. ब्लंड बैंकिंग

द. नेत्र बैंकिग

15.10 अभ्यासार्थ प्रश्न :

- 1. बायोरिएक्टर का सचित्र वर्णन करो ।
- 2. कोशिका, ऊतक व अंगों की बैंकिंग से आप क्या समझते हैं।
- 3. वीर्य बैंकिंग को समझाइये तथा इसकी वर्तमान समय में उपयोगिता समझाइये ।
- 4. त्वचा निर्माण व बैंकिंग के उपयोग एवं क्रियाविधि बताइए ।
- 5. नेत्र बैंकिंग पर विस्तृत लेख लिखिए।
- 6. बायोरिएक्टर का स्वनियंत्रण समझाइये।