


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №5 Тема: **«Фармацевтична біотехнологія рослин.»**
для аспірантів

Практичне заняття розробив:
асистент



_____ (Акішева А.С.)

підпис

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: Фармацевтична біотехнологія рослин.

Мета: Ознайомитись з основними напрямками розвитку біотехнології рослин охоплюють широке коло завдань, в тому числі отримання відновлюваної рослинної лікарської сировини і біологічно активних речовин (БАР) рослинного походження для сучасної медицини.

Основні поняття: каллус, фітогормони

Обладнання: згідно до вимог Належної аптечної практики (GPP).

Навчальний час: 4,0

План

I. Організаційний момент

Зміст теми

Вторинні метаболіти рослин - фармакологічно активні речовини

В даний час культура клітин вищих рослин є альтернативним способом отримання багатьох фармакологічно активних субстанцій з рослин. Основним же типом культивованих рослинних клітин є калусних тканину. Процес отримання первинного каллуса вимагає стерильних умов. Експланти рослин поміщають на штучне живильне середовище *in vitro*, яка включає мікро і макроелементи, вітаміни і фітогормони. При культивуванні на поживних середовищах важливими факторами є:

освітлення, температура, аерація, перемішування середовища та ін. калусних клітини, при тривалому культивуванні, можуть спонтанно купувати гормонезалежний, і далі рости на середовищі без фітогормонів. Природа такої незалежності до одного або обох гормонів (ауксину і цитокінінів) може бути генетичної (результат мутації) або епігенетичної (результат експресії генів, що визначають гормонезалежний зростання). Такі каллусов називають «звикла» тканиною. Прикладом гормонезалежний штаму може бути штам K27 зміїної (*Rauwolfia serpentine* Benth), отриманої шляхом обробки тканин

64клеточної лінії А мутагенів етиленіміну і подальшої селекцією за принципом «вміст алкалоїдів» на спеціально розробленої живильному середовищі, що забезпечує високий рівень накопичення індолінових алкалоїдів (0,9 - 1,2% аймалина в сухий біомасі). Калусних клітина і сам каллус притаманні всій рослині. Однак *in vivo* каллус виникає на рослині в окремих випадках, зазвичай при травмах, функціонує нетривалий час. Ця тканина захищає місце поранення, накопичує живильні речовини для анатомічної регенерації або регенерації втраченого органу. У культурі *in vitro* тип каллуса залежить від:

- 1) типу експлантів;
- 2) генотипу;
- 3) складу живильного середовища. За даними Л. А. Лутов (2010 р) при експлантації на живильне середовище *in vitro* клітини спеціалізованої

тканини повинні диференціюватися, т. Е. Втратити притаманну їм структуру і функцію, а також повернутися до стану ділиться клітини. Зазвичай клітини переходять до спеціалізації з фази G1, дуже рідко з фази G2, а в диференційованій тканини знаходяться на стадії G0. Важливу роль в цьому процесі відіграють фітогормони, які індукують клітинний розподіл і підтримують калусних тканини в що діляться стані. При цьому спостерігаються складні взаємини між ауксинами і цитокинінами. Присутність в середовищі одного ауксину визначає перехід спеціалізованої клітини з спочиває фази G0 до вступу в фазу S життєвого циклу, але для завершення фази S, т. Е. При підготовці до мітозу або мейозу, необхідні цитокиніни. Залежно від концентрації фітогормони викликають утворення каллуса різних типів. Каллус є аморфну масу, що складається з тонкостінних паренхімних клітин, які не мають суворої анатомічної структури. Колір може бути білим, жовтим, зеленим, пігментированим повністю або зонально. Каллусов, за існуючою класифікацією, підрозділяють на:

- 1) пухкі, сильно обводнені, легко розпадаються на окремі клітини;
- 2) середньої щільності, з добре вираженими меристематические вогнищами;
- 3) щільні, з зонами скороченої камбію і судин. Як правило, на середовищі з 2, 4Д (2, 4дихлорофеноксіуксусная кислота) каллусов стають пухкими і втрачають пігментацію. Каллус першого типу використовують для отримання суспензійних б5культур, другого типу - для підтримки зростання клітин і збереження культури в зростаючому стані. У інтактном рослині більшість спеціалізованих клітин не діляться, за винятком клітин, спеціалізація яких спрямована на розподіл. Процес втрати клітинної спеціалізації називають дедиференціровкой. Перший етап дедиференціровки для неделящихся спеціалізованих клітин рослин це відновлення здатності ділення. Частина рослини (органи, тканини, клітини) в порівнянні з клітинами тварин більш автономні, що пов'язано з тотіпотентностью рослинних клітин. Проявом тотіпотентності є здатність рослин до регенерації з одиничних клітин. Припускають, що чим менше спеціалізована клітина, тим легше вона буде дедиференціроваться. Найбільш детально процес дедиференціровки і каллусообразования вивчений на культурі тканин на дисках з різних зон коренеплоду моркви, бульби топінамбура і серцевини паренхіми стебла тютюну. Встановлено, що дедиференціровка спеціалізованих клітин починається з використання запасних поживних речовин, руйнування спеціалізованих клітинних органел:

хлоро, хромої лейкопластов;

потім відбуваються зміни в тонкій структурі клітин, збільшується число рибосом і елементів ЕПР, зростає число елементів апарату Гольджі, збільшується розмір ядерець. Ці зміни, як правило, передують початку поділу клітин або його супроводжують. При індукції до проліферації клітин диференційованої тканини важливо знати, чи всі вони тотіпотентність.

Отримання культури тканин не з апікальної і камбіальні меристем, а з спеціалізованих клітин дозволило встановити, що в культурі *in vitro* в мітотичний цикл входять, як правило, будь-які клітини, які не втратили ядро в процесі диференціювання. Значення ступеня диференціювання вихідної тканини для подальшої дедиференціації і вторинної диференціації привернуло до себе увагу лише в останні роки. Прикладами стійкого збереження в культурі *in vitro* видових і органних особливостей метаболізму можуть служити здатність до специфічних для даного виду рослин вторинним синтезам і збереження деяких властивостей вихідного органу і тканини. Здатність ізольованих тканин в умовах культури *in vitro* до синтезу речовин вторинного метаболізму, продуцентами яких є ці тканини в системі цілого рослини, встановлена для багатьох видів рослин. Так, в ізольованих коренях беладони і в культурі кореневих каллусов зберігається здатність до біосинтезу атропіну. Культура тканини раувольфії зміїної, отримана з кореня, зберігає здатність до синтезу резерпина, тоді як культура тканини стеблових походження цього алкалоїду не синтезував. Виявлена здатність до синтезу вторинних метаболітів становить основу для промислового використання культур тканин як продуцентів лікарських препаратів. Не менш цікаво і перспективно для практики тривале збереження культивованими клітинами метаболічного профілю, властивого вихідної тканини, а саме збереження специфічно вуглецевого обміну, специфічних антигенів та ізоферментних спектрів алкогольдегідрогенази, аспартатамінотрансферази, глутаматдегідрогенази, сукциндегідрогенази та інших. Таким чином, основні особливості вихідної тканини при отриманні від неї перевірених клітинних культур тривало зберігаються, що пояснюється стійким збереженням стану репресії або дерепресії генів. Рослини завжди служили людині як джерело їжі, ефірних масел, барвників і лікарських сполук. Так, мак снодійний (*Papaver somniferum*) є джерелом безпечного речовини кодеїну; з наперстянки (*Digitalis lanata*) отримують дигоксин, тонізуючий серцеву діяльність;

з хінного дерева (*Cinchona ledgeriana*) антималярійного засіб «хінідин». Особливе місце займають наркотики і стимулюючі речовини. У невеликих, строго контрольованих кількостях їх використовують в медицині. Однак при систематичному вживанні низьких концентрацій наркотиків виникає наркозалежність і прагнення до збільшення споживаної дози. Застосування високих концентрацій наркотику вбиває людину. Найбільш відомі опіум і героїн з *Papaver somniferum*, кокаїн з *Erythroxylon*, нікотин з різних сортів тютюну. Найбільш відомий стимулятор - кофеїн, що міститься в рослинах чаю і кави. Стимулятори не токсичні у концентраціях, рекомендованих до застосування. Однак високі їх концентрації негативно впливають на серцево-судинну і нервову систему людини. Здатність інтактних рослин синтезувати різні сполуки привела до припущення, що тим же властивістю матимуть

клітини і тканини цих рослин, що вирощуються в стерильних умовах. Для деяких культур це виявилось справедливим. Але в окремих випадках клітини або не проявляли здібності до синтезу необхідних речовин, або синтезували їх у мінімальній кількості. Знадобилися довгі експерименти по підборі поживних середовищ, умов культивування, дослідження нових штамів, отриманих завдяки генетичній гетерогенності калусних клітин або застосування мутагенних чинників, щоб домогтися серйозних успіхів в цій області. За останні роки були отримані експериментальні дані, які свідчать про те, що для отримання культури продуцентів з високим синтетичним потенціалом важливо враховувати такі особливості:

- відбирати рослини, в яких вміст біологічно активних речовин максимально в порівнянні з іншими особинами цього виду;
- для ініціації культури тканини необхідно використовувати органи рослин, в яких відбувається синтез і накопичення даних речовин, що дозволить урізноманітнити і збагатити склад продуцентів;
- при культивуванні тканин в умовах *in vitro* необхідно враховувати такі умови як:
 - наявність у складі живильного середовища джерел вуглецевого харчування;
 - наявність у складі живильного середовища мінеральних речовин:
 - джерел азоту, фосфору, калію, сірки, кальцію та інших макро- і мікроелементів;
 - наявність у складі живильного середовища вітамінів і амінокислот, які сприяють синтезу вторинних метаболітів;
 - наявність определенних тїпов гормонів і стимуляторів, що підтримують здатність клітин до поділу і стимуляцію синтезу вторинних метаболітів;
 - наявність або відсутність у складі живильного середовища вуглекислого газу;
 - наявність освітлення і попередників кінцевих продуктів;
 - температура культивування і рН середовища;
 - наявність асептики. Найбільш часто використовуються наступні поживні середовища:

Середа Мурасіге - Скуга (універсальне середовище, 1962 г.) - придатна для освіти калусов, підтримки неорганізованого калусних зростання, індукції морфогенезу у більшості дводольних рослин. В даному середовищі зміна співвідношення ауксина і кинетина призводить до утворення або коренів (переважання ауксина), або стеблових культур (переважання кинетина). За даними дослідників в середовищі Мурасіге - Скуга спостерігається інтенсивний синтез вторинних метаболітів. Середа Гамборга - Евелега (1968 г.) - придатна для культивування клітин і тканин бобових рослин, злаків. При приготуванні твердих поживних середовищ для поверхневого вирощування калусних тканин, наприклад тканин женьшеню, використовують очищений агар-агар (полісахарид з морських водоростей). Наявність в складі

живильного середовища джерел вуглецевого живлення. Найбільш ефективним джерелом вуглецю для культури тканин рослин зазвичай служить сахароза і рідше глюкоза, використовувані в концентрації 2 - 3%. Для культури ряду рослин рекомендовано використання 5 - 7% розчину сахарози. При концентраціях сахарози в концентрації 2 - 7% спостерігається ефективний синтез культурою вторинних метаболітів. Необхідно відзначити, що є численні роботи про можливості культивованих клітин метаболізувати і інші цукру. Однак накопичення вторинних метаболітів в цьому випадку було незначним. Сахара необхідні в якості поживного компонента, т. К. Основні калусних культури тканин позбавлені хлорофілу і не здатні до автотрофне харчування. Внаслідок цього, їх вирощування відбувається при розсіяному освітленні або темряві. Наявність в складі живильного середовища мінеральних речовин:

джерел азоту, фосфору, калію, сірки, кальцію та інших макро- і мікроелементів. Мінеральний склад культуральної середовища надає на синтез вторинних метаболітів істотний вплив. При цьому найбільш важливе значення мають фосфор, калій і різні форми азоту. Високі концентрації фосфору, в більшості випадків, призводять до поліпшення росту культури і погіршення синтезу вторинних метаболітів. Синтез вторинних метаболітів починається після виснаження фосфатів в живильному середовищі. Так, наприклад, високі концентрації фосфору знижують синтез нікотину в культурі клітин тютюну, антоціанів в культивованих клітинах моркви, фенолів в культурі чаю і т. Д. Органічні форми азоту (пептони, дріжджові екстракти та ін.) Гальмують зростання тканин і синтез вторинних метаболітів. Збільшення синтезу вторинних метаболітів сприяє наявність в культуральному середовищі неорганічного азоту в формі нітратів і солей амонію. Наявність в складі живильного середовища вітамінів і амінокислот, які сприяють синтезу вторинних метаболітів. До складу поживних середовищ вводять вітаміни:

тіамін в кількості 0, 4 - 1, 0 мг / л;

піридоксин - 0, 1 - 0, 5 мг / л;

нікотинова кислота - 0, 5 - 1, 0 мг / мл та ін. Наявність

определенних тїпов гормонів і стимуляторів, що підтримують

способність кліток до подїлу і стимуляцію синтезу вторинних метаболїтів.

Основними фитогормонами, що є індукторами і регуляторами синтезу

вторинних метаболїтів є ауксини (викликають диференціювання клітин експлантов) і цитокїніни (їндукують клітинний розподїл). Їх вигляд,

концентрація і співвідношення повинно визначатися дослідником для кожного конкретно об'єкта культури клітин рослин. Це пов'язано з тим, що в

одних випадках фитогормони можуть підвищувати зростання культури і синтез вторинних метаболїтів, а в інших приводити до його зниження. Стимуляторами росту (типу ауксинів) є:

Зіндолілуksусная кислота в кількості 0, 1 - 1, 0 мг / мл;

□ нафтілуksусная кислота - 1 - 2 мг / мл;

2, 4дїхлорфеноксикуksусная кислота (2, 4D) - 1 - 2 мг / мл. Стимуляторами росту цїтокініновьявляються:

кінетин, 6-бензіламінопурїн, аденін в концентраціях 0, 2 - 0, 5%. Так само в як стимулятора росту рослин за останнім часом запропоновані й інші сполуки, наприклад, мелафен, який представляє собою меламинову сіль біс (оксиметил) -фосфінової кислоти. Так, наприклад, запропоновано використовувати мелафен як регулятора росту для збільшення накопичення берберина в клітинній культурі василістника малого (*Thalictrum Minus*). Автори провели порівняння ефективності біосинтезу алкалоїду берберина при використанні класичних стимуляторів росту (2, 4D - в концентрації $1 \cdot 10^4$ г / чи кінетин - в концентрації $5 \cdot 10^4$ г / л) і мелафена- (в концентрації $106 \cdot 10^8$ г / л).

Встановлено, що через 15 дїб культивування з мелафеном кількість берберина складало 138, 1 мг / л, в той час як при використанні класичних стимуляторів росту - 50, 1 мг / мл. Таким чином, застосування мелафена призводило до збільшення виходу алкалоїда в 2, 8 рази. Наявність або відсутність у складі живильного середовища углекислого газу. Зміст в середовищі вуглекислого газу повинно визначатися дослідником для кожного конкретно об'єкта культури клітин рослин. Істотним є співвідношення між киснем і вуглекислим газом, т. К. Високе співвідношення O₂:

CO₂ пригнічує ріст клітин в культурі і накопичення вторинних метаболітів. Наявність освітлення і попередників кінцевих продуктів. Так як, калусних тканини не здатні до фотосинтезу, Тоон можуть рости в умовах слабого освітлення або в темряві. У більшості досліджень встановлено, що світло має активізує дію, як на ріст клітин, так і на синтез вторинних метаболітів. Як джерело світла використовують люмінесцентні лампи (оптимум 1000 люкс). Більш висока освітленість пригнічує ріст культури. У той же час додавання в культуральне середовище попередників вторинних метаболітів в більшості випадків не призводило до посилення їх синтезу. Температура культивування і рН середовища. Дані літератури підтверджують вплив температури на ріст культури і утворення вторинних метаболітів. Так, наприклад, авторами показано, що оптимум синтезу нікотину в клітинах тютюну знаходиться при температурі 27 ° С, а відхилення на 5 ° в будь-яку сторону призводить до зниження синтезу нікотину в 3 рази. Дані про вплив величини рН на ріст клітин і синтез вторинних метаболітів, наявні в літературі, вельми суперечливі. Величина рН повинна визначатися дослідником для кожного конкретно об'єкта культури клітин рослин. Наявність асептики. Культивування фрагментів тканини, органу рослини - експлантов і окремих клітин вимагають дотримання асептики на всіх етапах культивування,

включаючи стерильність рослинних тканин, обладнання та інвентарю, подачі стерильного повітря і навичок роботи персоналу в асептичних умовах. Особливою обробки вимагають рослинні тканини, які можуть служити джерелом зараження - на їх поверхні завжди знаходиться епіфітна мікрофлора. Стерилізацію проводять за наступною схемою:

частина рослини, з якої буде вилучено експлантов, промивають водою з милом і споліскують стерильною водою;

потім підготовлений матеріал стерилізують в розчинах дезінфікуючих засобів (10 - 12% перекис водню, 0, 1% сулема, 0, 1% діацід) шляхом видержівання експлантов протягом певного часу (насіння сухі - 10 - 20 хв, насіння набряклі - 6 - 10 хв, тканини стебла - 20 - 40 хв, листя - 0, 5 - 5 хв, апекси - 0, 5 - 10 хв.);

після витримування експлантов в дезінфікуючих розчинах їх кілька разів промивають в дистильованій воді і скальпелем видаляють зовнішній шар клітин на зрізах експлантов (так як він може бути пошкоджений при стерилізації);

мікроорганізми можуть перебувати і всередині рослинної тканини, що вимагає застосування антибіотиків, які здатні вбити мікрофлору всередині тканини. Зазначені операції необхідно проводити в зоні ламінарії при подачі стерильного повітря. В даний час промислове отримання фармакологічно активних вторинних метаболітів - вельми перспективний напрям біотехнології. Синтез вторинних метаболітів проходить, головним чином, в суспензійній культурі клітин, в регульованих умовах, тому не залежить від кліматичних факторів і пошкодження комахами. Виробничі площі для вирощування культури мінімальні, в порівнянні з природним масивом плантацій відповідних рослин. Культури клітин рослин можуть синтезувати практично всі класи сполук вторинного обміну, причому досить часто в кількостях, в кілька разів перевищують їх синтез в інтактних рослинах. Наприклад, вихід аймаліціна і серпентину в культурі клітин *Catharanthus roseus*, становить 1, 3% від сухої маси, а в цілому рослині - 0, 26%. У культурах клітин може початися синтез речовин не характерних для вихідної рослини, або розширюється набір синтезованих сполук. У ряді випадків в клітинній культурі утворюються речовини, які синтезувалися інтактним рослиною на ювенільній фазі розвитку, або речовини, що містилися в клітках філогенетично більш ранніх груп рослин. Так, наприклад, в культурі клітин маку пріцветніковий (*Paraver bracteatum*) міститься вторинний метаболіт - сангвірін, характерний для ювенільних рослин, і не виявляється тебаїн, який синтезується дорослими рослинами. Синтез вторинних метаболітів може корелювати з процесом диференціювання в культурі клітин. Наприклад, в суспензійній культурі маку снотворного *Paraver somniferum* максимальний синтез алкалоїдів починається тільки після диференціації досить великої кількості спеціалізованих клітин молочних судин, призначених для

депонування метаболітів. У той же час, культури клітин тютюну (нікотин) і моркви (антоцианин) синтезують велику кількість метаболітів при слабо диференційованих клітинах. Сьогодні неможливо однозначно відповісти на питання чи існує зв'язок між зростанням клітин і накопиченням вторинних метаболітів. Розподіл клітин, що приводить до збільшення клітин біомаси, і синтез вторинних метаболітів роз'єднані в часі. Синтез вторинних метаболітів зростає в фазі уповільненого зростання клітинної популяції (ростові процеси особливо активні) і досягає максимуму в стаціонарній фазі (приріст клітинної маси припиняється). Однак є культури, наприклад, культура клітин *Catharanthus roseus*, у яких синтез вторинних метаболітів супроводжує весь період зростання. Важлива особливість культивованої популяції клітин - її стабільність у відношенні синтезу і накопичення продуктів вторинного синтезу. Так, у відділі біології клітини та біотехнології інституту фізіології рослин РАН, під керівництвом відомого фахівця в біотехнології рослин Р. Г. Бутенко, були отримані різні штами клітин *Dioscorea deltoidea*, в тому числі штамм-сверхпродуцент ІФР ДМ0, 5. Всі ці штами зберігали стабільність щодо синтезу фураностанолового глікозидів близько 26 років. Цікава особливість більшості клітин в культурі полягає в тому, що зазвичай ці клітини не транспортують синтезовані метаболіти в живильне середовище або інші клітини, хоча деякі культури є винятком, зокрема культура клітин маку, які депонують алкалоїди в молочні судини. Синтез вторинних метаболітів в культивованих клітинах пов'язаний з внутрішньоклітинними органелами, в основному з пластидами і ендоплазматичним ретикулумом. У 73клетках, нездатних до транспорту метаболітів, продукти вторинного синтезу зазвичай накопичуються в вакуолях і вільному просторі клітин. Для отримання вторинних метаболітів можливо культивування не тільки суспензійних клітин, але і каллуса на твердому живильному середовищі (наприклад, каллус женьшеню). Так, наприклад, технологія виробництва біомаси женьшеню з каллуса освоєна на Бердичівському республіканському унітарному підприємстві «Гідролізний завод». На синтез вторинних метаболітів впливає цілий ряд факторів. Перш за все, вихід продукту залежить від генотипу рослини-донора. Показано, що культури клітин, отриманих від високопродуктивних рослин, продукували більше число метаболітів. Інший важливий фактор - склад живильного середовища і концентрація її компонентів, які повинні забезпечувати, з одного боку, збільшення кількості клітин продуцентів, а з іншого - посилювати сам процес синтезу. На зростання, т. Е. На збільшення біомаси, істотно впливає природа і кількість вуглеводів, сполук азоту та фосфору, на синтез метаболітів - природа і концентрація фітогормонів. Так, при заміні одного ауксину на інший, наприклад, нафтілуксусной кислоти на 2, 4D, трикратно збільшився синтез антрахинона суспензійний культурою *Morinda citrifolia*. Дуже великий вплив на зростання суспензійний середовища надає її

безперервне перемішування, яке забезпечує достатню аерацію і предотвращає осадження клітин. У лабораторних умовах перемішування досягається завдяки використанню качалок або роллерних установок. При промисловому вирощуванні суспензійних культур застосовують спеціальні системи (біореактори), в яких йде збільшення біомаси і синтез вторинних з'єднань. Ці системи мають важливими перевагами:

можливістю керувати процесом культивування на основі показників датчиків;

великий обсяг культивованого матеріалу дозволяє забирати значні проби, при цьому стресових реакцій у культури клітин не виникає. Залежно від способу перемішування культуральної рідини біореактори ділять на дві групи:

I група включає біореактори, в яких суспензійна культура перемішується тільки за рахунок подачі повітря;

II група - в цій групі біореакторів культура перемішується механічним способом. Вирощування культур рослинних клітин в біореакторах проводять в двох режимах:

- періодичне культивування - полягає в тому, що після закінчення процесу відкачують і використовують всю суспензію клітин;

- проточне культивування - в біореактор постійно додають свіжу живильне середовище, і одночасно відбирають той же обсяг або суспензії (відкрите проточне культивування), або однуотрабатанную питательную среду, залишаючи клітини в реакторі (закрите проточне культивування). Існує два різновиди відкритого культивування:

турбідостат - має на увазі вимір і автоматична підтримка концентрації клітинної біомаси в реакторі на одному рівні шляхом зміни швидкості потоки;

Хемостат - полягає в подачі в біореактор з постійною швидкістю живильного розчину при одночасному відкачуванні з тією ж швидкістю клітинної суспензії. Існує ще одна сучасна технологія отримання вторинних метаболітів за допомогою іммобілізованих клітин культури, т. Е. Пріміщення їх в певний носій або адсорбція в ньому.

Носій з клітинами поміщають в живильне середовище. Клітини залишаються живими. Вони припиняють зростання, але продовжують синтез метаболітів, виділяючи їх в середу. Встановлено, що часто синтез вторинних метаболітів в суспензійній культурі зупиняється на проміжних етапах, не доходячи до необхідного продукту. Отримання продукту можливо завдяки процесу біотрансформації. Сутність його полягає в зміні проміжних метаболітів за допомогою культур інших рослин або клітин бактерій. Біотрансформація високоефективна в клітинах бактерій, тому рослинні клітини використовують, коли процес не здійснюється в клітинах мікроорганізмів. Введені в ці культури речовини можуть піддаватися гідроксилюванню,

епоксидірованія, глюкозилірованію, етерифікації, а також приєднуватися до амінокислот. Наприклад, культура клітин женьшеню кореневого походження здатна трансформувати (глюкозиліровать) фенольні сполуки - продукти діяльності суспензійний культури клітин кореня женьшеню (*Panax ginseng*). Культури клітин лободи і картоплі можуть біотрансформуватися індолил-3-оцтової кислоти в індолилзацетіл-аспарагінову кислоту. Ще один приклад - біотрансформація карденолідів, глікозиди яких використовують в медицині для лікування хвороби серця. Рослини наперстянки (*Digitalis lanata*) у великій кількості синтезують дигитоксин замість необхідного дигоксину. Для відповідної біотрансформації з успіхом використовують недиференційовану суспензійну культуру наперстянки. Імобілізовані клітини цієї культури здатні довгий час з постійною швидкістю трансформувати β -метилдигитоксин в β -метилдигоксин. Початковим джерелом отримання алкалоїдів є рослини різних сімейств, які ростуть ендемічні в різних країнах. Так, наприклад, Раувольфія зміїна (*Rauwolfia serpentina* Benth) произрастает в Індії, Бірмі та Африці;

Стефанія гладка (*Stephania glabra* (Roxb.) Miers) - багаторічна тропічна трав'яниста рослина сімейства луносемянникових - виростає переважно в субтропічних районах, коріння і коренеплоди рослини містять алкалоїди Стефаглабріна (стефарін), цikleанін, пальматин, корідін, гіндарін і ін.;

Тис коротколістна (*Taxus brevifolia*) або Тис гострий (*Taxus cuspidate*) виростає в Кореї, є продуцентом таксолу, що володіють високою протипухлинною активністю по відношенню до різних ліній злоякісних клітин, в тому числі і меланомних. Наводимо кілька прикладів культур продуцентів, які накопичують фармакологічно активні вторинні метаболіти:

- алкалоїди барвінку рожевого (*Vinca rosea*, синонім - *Catharanthus rosea*), які активно застосовуються в якості протипухлинних препаратів, що надають цитостатичну дію на пухлинні клітини завдяки здатності блокувати мітоз на стадії метафази. Ці алкалоїди входять до складу препарату «Розевін». В даний час створені культури продуценти цих алкалоїдів, що перевершують по синтетичній активності вихідні рослини. Серед них штамми, в яких відбулося змішання синтезу в сторону одного з кінцевих метаболітів - серпентину або аймаліціна;

- таксол і інші таксани - вторинні метаболіти, отримані в суспензійній культурі тиса (*Taxus canadensis*), які активно застосовуються в якості протипухлинних препаратів, що надають цитостатичну дію на пухлинні клітини;

- індоліні алкалоїди (резерпін, аймалин, аймаліцин, раувольфін, зміїний, іохімбін і ін.), Отримані в суспензійній культурі зміїної (*Rauwolfia serpentina*

Benth), застосовуються в медицині як гіпотензивних, антиаритмічних, заспокійливих центральну нервову систему речовин.

Дані вторинні метаболіти в комплексі або окремо входять в лікарські препарати:

«Резерпін» - застосовується в терапії гіпертонічної хвороби і психічних розладів);

«Раунатин», «Аймалін» - антиаритмічний засіб, знижує збудливість міокарда, подовжує рефрактерний період, гальмує внутрішньошлуночкову провідність;

«Раувазан», «Іохімбін» - сильне місцевоанестезуючу речовина, розширює судини шкіри і слизових оболонок, антиметаболит серотоніну застосовується для лікування імпотенції у чоловіків і ін.;

- алкалоїди барбарису, отримані в суспензійній культурі (*Berberis parvifolia*), використовуються для зниження артеріального тиску, підвищення тону мускулатури матки;

- алкалоїди маку прицветниковий (*Papaver bracteatum*) - сангвінарін - застосовується в медицині як антимікробний засіб. Алкалоїд в культурах тканини синтезується в кількостях переважаючих зміст в інтактних рослинах.

- алкалоїди маку снотворного (*Papaver somniferum*) - опіатні алкалоїди (морфін, папаверин, кодеїн), що відносяться до наркотичних речовин, отримані на суспензійній культурі тканин;

- кардіотропну глікозиди, отримані в суспензійній культурі наперстянки (*Digitalis lanata*) - застосовуються при порушенні моторики серця. Суспензійні культури здатні до синтезу вторинних метаболітів, що перевищують інтактні рослини, як за кількістю, так і за різноманітністю глікозидів;

- тритерпенові сапоніни (глікозиди) женьшеню (*Panax ginseng*) отримують з суспензійний і калусних культур. Використовуються в медицині при гіпотонії, втоми, неврастенії другіх захворюваннях;

- убіхінон отримують в промислових масштабах з суспензійних культур *N. Tabacum*. Убіхінон використовуються в медицині і косметології. У табл. 4 представлені хімічні структури алкалоїдів. Таблиця 4 - Хімічна структура алкалоїдів

Алкалоїди	Хімічна структура
1	2
Тавол	
Резерпін	

Абіксин	
Морфін	
Папаверин	
Кодєїн	

Метод мікроін'єкцій ДНК.

Для перенесення чужорідної ДНК в рослинні клітини застосовуються скляні мікроголки, які за допомогою мікроманіпулятора вводяться в клітку. Потім гідравлічною системою з мікроголки видавлюється ДНК у відповідному буферному розчині. Приблизний обсяг ін'єкції в кожену рослинну клітину складає 108 - 109мл. Перевагою даного методу трансформації є можливість використовувати в якості мішеней, як поодинокі культивовані клітини, так і клітини соматичних тканин. Метод мікроін'єкцій ДНК, яка є видоспецифічності, значно розширює коло потенційних об'єктів трансформації. Трансформація рослинних клітин методом мікроін'єкцій при використанні різного типу векторних ДНК відбувається з ефективністю 10 - 20%. Частоту трансформації можна підвищувати, вводячи чужорідну ДНК безпосередньо в ядро, а не в цитоплазму рослинної клітини. Метод електропорації. Даний метод вперше був застосований по відношенню до клітин тварин, а потім модифікований і для рослинних протопластів. Процедура електропорації полягає в тому, що рослинні протопластів в високих концентраціях піддаються дії високовольтних електричних імпульсів, які можна зупинити підсилюють проникність біомембран. Молекули нуклеїнових кислот, що додаються в середу для електропорації, поглинаються клітинами переважно через пори в клітинних мембранах. Так, за допомогою методу електропорації вдалося ввести РНК вірусу тютюнової мозаїки в протопластів *Nicotiana tabacum*. При цьому з метою підвищення частоти трансформації проводилося подальше за процедурою електропорації

10ти 30ти хвилинне охолодження суспензії протопластів і вірусної РНК. У разі 10ти хвилинного охолодження частота трансформації становила 29%, а при 30ти хвилинному охолодженні - 55%. Експресія вводиться в протопластів чужорідної ДНК (або РНК) при електропорації визначається вже через кілька годин. Метод бомбардування мікроснарядомі. Даний метод полягає в бомбардуванні рослинних клітин високошвидкісними вольфрамовими мікроснарядомі, що несуть нуклеїнові кислоти. Захоплення нуклеїнових кислот вольфрамовими мікроснарядомі відбувається в результаті додавання розчину, що містить нуклеїнову кислоту, до суспензії вольфрамових часток і подальшого центрифугування. Суспензія мікроснарядов поміщається в спеціальний пристрій, на передню поверхню циліндричного макроснаряда. Переміщаючись по осьового валу пристрою, макроснаряд сприяє прискоренню мікрочастинок. Високошвидкісні вольфрамові мікроснаряди проходять через отвір в сталевій пластинці пристрою і проникають в рослинні клітини мішені, розташовані на відстані 10 - 15 см. Експресія введених маркерів спостерігається в 30 - 40% клітин, які зазнали бомбардування. Даний метод є одним з альтернативних способів подолання проблеми обмеженого кола рослин, чутливих до трансформації. Метод бомбардування мікроснарядомі не вимагає використання культури клітин і попередньої обробки реципієнтних клітин. Метод бомбардування високошвидкісними золотими частинками, покритими ДНК. Вперше цей метод був використаний для трансформації клітин, виділених із зародків сої. Суспензію золотих частинок, покритих плазмідної ДНК, готують таким чином. Виділені з *Agrobacterium* плазмиди додають до суспензії, що містить золоті частинки діаметром від 1 до 5 мкм, потім суспензію висушують потоком азоту і прискореними в електричному полі золотими частинками бомбардують рослинні протопластів. Отримані результати показують, що бомбардування високоскоростнимізолотимі частинками, покритими ДНК, призводить до стабільної трансформації клітин. Цей метод можна застосовувати по відношенню до різних рослинним тканинам. Метод трансформації за допомогою наночастинок - ліпосом. В даному розділі немає необхідності зупинятися на структурі ліпосом, їх склад та способи отримання, так як раніше ми докладно висвітлювали ці питання. На перших етапах даний метод трансформації був використаний для введення нуклеїновихкислот в культуру клітин тварин. Надалі, використовуючи протопластів, з'явилася можливість введення генетичного матеріалу в рослинні клітини. Инкапсулирование нуклеїнових кислот носить випадковий характер, тому вихід ліпосом, придатних для подальшої трансформації, в значній мірі залежить від кількості вихідних реагентів. Тип фосфоліпідів має важливе значення для взаємодії ліпосом з протопластами різних видів рослин. Залежно від фосфоліпідів, що входять до складу мембрани, ліпосоми

можуть бути або катіонними або аніонними, або нейтральними. У процесі поглинання ліпосом і їх вмісту протопластами рослин виділяють три етапи:

1) асоціацію ліпосом з рослинними протопластами;

2) ендоцитоз ліпосом;

3) руйнування мембрани ліпосом і вивільнення нуклеїнових кислот. На ефективність цього методу трансформаціїоказиваєт вплив ряд факторів: концентрація ПЕГ;

концентрація іонів металу в інкубаційному буфері;

час інкубації ліпосом з протопластами. Основними перевагами методу трансформації за допомогою ліпосом, є:

- забезпечення схоронності нуклеїнових кислот від розщеплення нуклеазами, присутніми в клітинній культуральному середовищі;

- вкрай низька токсичність ліпосом по відношенню до рослинних клітин;

- можливість застосування методу до різних видів рослин. Метод агробактеріальної трансформації. Іспользованієприродних векторів, таких як Тіплазміда *Agrobacterium tumefaciens* Ріплазміда *Agrobacterium Rhizogenes* - широко поширений підхід до введення чужорідної генетичної інформації в клітини вищих рослин. Як рослин зазвичай використовують стерильні рослини або експланти різних органів. Даний методімеєт ряд істотних недоліків. Одним з них є обмежене коло господарів агробактерій. Існує можливість прямого перенесення агробактеріальної ДНК в рослинні клітини, що сприяє трансформації однодольних рослин, недосяжних для плазмидной системи *A. tumefaciens* *A. Rhizogenes*. Розробка способів прямого перенесення ДНК в рослини до недавнього часу була обмежена в зв'язку з клітинною стінкою рослин. Ця проблема була вирішена шляхом використання рослинних протопластів, т. Е. Клітин, позбавлених стінок. Однак пряме перенесення агробактеріальної ДНК в рослини має ряд недоліків:

низька частота трансформації;

методи отримання протопластів розроблені не для всіх культурних рослин;

регенерировать целые растения из протопластов пока еще невозможно для ряда культур.

Рослинні вакцини

Вакцини рослинного проісхожденіяпредставляють собою вакцини на основі трансгенних рослин, в геном яких був вбудований відповідний фрагмент генома патогенного мікроорганізму. Перша така вакцина отримана в 1992 році Ч. Арнтzenом. Трансгенні рослини тютюну стало продукувати «Австралійський антиген» (HBsAg) - антиген вірусу гепатиту В. Отриманий з рослин і частково очищений антиген, введений мишам, викликає імунну відповідь подібний вакцинації проти гепатиту В. У 1998 році за допомогою картоплі, яка продукує Всуб'єдініцу холерного антигену, була отримана захист у мишей при зараженні збудником холери. Аналогічна вакцина була

отримана на тютюні, продуцирующем антигени вірусу кору. Проведено роботи по отриманню вакцини проти сказу на помідорах. На даний момент бульби картоплі трансгенних сортів, які експресують бактеріальні токсини і антигени гепатиту В (рівень антитіл при використанні картофеляпревисіл рівень захисного титру у людей - 10 МО / мл) і вірусу Норфолка, в сирому вигляді представляють собою їстівні вакцини, успішно пройшли Іфазу клінічних випробувань. Вакцина проти вірусу Норфолка, отримана на трансгенному картоплі була ізученана 20 добровольцях, 19 з яких (95%) показали високий рівень імунної відповіді. Розпочато роботи по створенню вакцин проти туберкульозу в листі салату.

Застосування їстівних вакцин рослинного походження значно полегшує процеси виробництва препаратів і їх доставки в організм. З огляду на, що більшість патогенів потрапляє в організм через слизові оболонки, створення і підтримання повноцінного місцевого імунітету слизових оболонок повинно забезпечити захист людини від більшості інфекційних захворювань. Особливо привабливим виглядає пероральне застосування рослинних вакцин, т. К. Воно дозволяє уникнути використання ін'єкційних процедур. Крім того, рослинні вакцини не містять тваринних білків і патогенів тваринного походження. Трансгенні рослини, такі як картопля, помідори, банани, до складу яких входять необхідні для вакцинації антигени можна вирощувати в промислових масштабах і при цьому немає необхідності всозданідорогостоящих технологічних процесів і унікального обладнання. Одним з критеріїв приємлостіявляється їстівність плодів рослин в сирому вигляді, що дозволить уникнути втрати антигенної активності при термічній обробкерастеній. У той же час, для практичного використання рослинних вакцин доведеться відповісти на ряд суттєвих питань:

- можливість збереження антигенів в кислому середовищі шлунка;
 - здатність переносити зберігання і вивчення температурних режимовхраненія;
 - детальне вивчення можливості розвитку імунологічної толерантності слизової оболонки ротової порожнини при вживанні їстівних вакцин;
 - розробка протоколів прийому рослинних вакцин;
 - вивчення і підбір ад'ювантов, що підвищують ефективність таких вакцин;
 - підбір оптимального методу введення генного матеріалу:
або за допомогою генних гармат при бомбардуванні ембріональних клітинних культур рослин, або за допомогою бактерії *Agrobacterium tumefaciens* для доставки в геном рослин плазмиди з встроеною ДНК.
- Сьогодні в РФ в Сибірському інституті фізіології і біохімії рослин АН спільно з НПО «Вектор» (Новосибірськ) і вченими з США проводяться спільні роботи зі створення вакцин для перорального застосування. На основі трансгенних рослин розробляються інноваційні вакцини проти небезпечних інфекцій в формі капсул. Запропоновано наступні кандидати вакцин:

1 - комбінована вакцина проти СНІДу і гепатиту В;

2 - вакцина проти гепатиту В;

3 - вакцина проти цервікального раку. Механізм імунізації «їстівними вакцинами» заснований на антигенпредставляючі здатності перитонеальних макрофагів тонкого кишечника ссавців. У кишечнику чужорідний білок, що володіє антигенними властивостями, розпізнається спеціальними М-клітинами, які широко представлені в товщі слизового епітелію. М-клітини транспортують захоплений антиген до перитонеальним макрофагам і В-лімфоцитів, що знаходяться в лімфоїдних утвореннях тонкого кишечника (песрових бляшках). В результаті презентації антигену на поверхні антигенпредставляючих клітин відбувається активація Т-лімфоцитів - хелперів, які в поєднанні з антигеном активують В-лімфоцити.

Рослини - продуценти імуноглобулінів

З огляду на потенційні переваги геноінженерний системи рослин, виправданим було б замінити клітини ссавців при виробництві антитіл на рослині. У 1989 году бил створені перші трансгенні рослини тютюну, які продукують функціонально активні моноклональні антитіла IgG1. Для цього ДНК-копії матричних РНК, виділених з мишачою гібридомі 6D4 ікодуючих легку (каппа) і важку (гамма) ланцюга імуноглобуліну IgG1, вбудували в агробактеріальної бінарний експресуючий вектор. Отримані гібридні конструкції для кожної ланцюга імуноглобуліну перенесли в клітини тютюну, на селективної середовищі відобразили трансгенні рослини і охарактеризували продукцію відповідних цільових білків. Трансформантів, які продукують індивідуальні ланцюга імуноглобуліну, схрестили і отримали потомство, експресують обидві ланцюга. У таких рослинах ланцюга обох типів об'єднувалися і утворювали 95функціонально активні молекули, специфічно зв'язуються з відповідними антигенами. Функціональні антитіла накопичувалися в кількості, що досягає 1, 3% сумарного білка листа. Експериментально було встановлено, що для складання молекули імуноглобуліну необхідна секреція обох ланцюгів, т. Е. Кожна ланцюг повинна синтезуватися в вигляді пребелка, на Нконце якого перебувати сигнальний пептид. Надалі в ряді лабораторій були отримані трансгенні рослини, які продукували різні повнорозмірні імуноглобуліни, або так звані одноцепочечніє варіабельні фрагменти (scFv - singlechain variable fragment) імуноглобулінів, що представляють собою варіабельні області важкої і легкої ланцюгів, з'єднані лінкерних пептидом. При випробуваннях на добровольцях було показано, що антитіла проти Streptococcus mutants (основний агент, що викликає карієс зубів), вироблені в рослинах тютюну, після нанесення на зуби захищають їх від карієсу, по крайній мере, в протязом чотирьох місяців. Синтезовані в рослинах сої та кукурудзи антитіла проти вірусу герпесу (тип 11) в експерименті запобігали генітальний герпес у мишей. Ці результати вказують на велику перспективність досліджень по створенню рослин, які

продукують специфічні імуноглобуліни. Рівень продукції чужорідних поліпептидів може істотно залежати від виду рослини або тканини, в яких вони синтезовані. Наприклад, один і той же вид рекомбінантних антитіл в листі трансгенного тютюну накопичувався лише до 0,04% сумарного білка, в той час як в листі арабидопсиса - до 3,0%. Відмінності в Глікозилування білків, синтезованих в клітинах рослин і ссавців - головна проблема при використанні їх в медицині. Глікопротеїни, продуковані в рослинах, мають дві додаткові вуглеводні детермінанти:

(1, 2) -ксілозу і (1, 3) -фукозу. Було висловлено припущення, що такі олігосахаридні залишки, які не знайдені в N-гліканах ссавців, можуть виявитися алергенними для людини, так як в крові експериментальних тварин виявлено специфічні IgE проти рослинних вуглеводних детермінант. Хоча це не може безпосередньо розцінюватися як показник алергії, проте, краще уникати можливих побічних ефектів при використанні рекомбінантних білків в клінічній практиці. Порівняння процесів синтезу N-гліканов в клітинах рослин і ссавців показало, що ключовим ферментом, здатним перетворювати рослинні N-глікани в N-глікани ссавців, є (1, 4) - галактозилтрансфераза. Було проведено схрещування трансгенних рослин тютюну, що експресують цей фермент, з рослинами, що продукують одночасно важку і легку ланцюга імуноглобуліну. У потомстві, продуцирующем три чужорідних білка, до 30% молекул імуноглобуліну містили галактозілірованіе N-глікани. Отримані результати дозволяють надіятися на те, що в найближчі роки більшість проблем з модифікацією білків людини, синтезованих в трансгенних рослинах, буде вирішено і «рослинні антитіла» будуть широко використовуватися в клініці. Такому прогнозом має сприяти і те, що по виробленим оцінками, антитіла, синтезовані в трансгенних рослинах, помітно дешевше в порівнянні з цими ж антитілами, виробленими в культурі клітин ссавців або молоці трансгенних тварин. У 1955 році датський дослідник Нільс Ерне розробив новий теоретичний метод, який забезпечував величезну різноманітність антитіл, які захищають організм від чужорідних клітин і молекул. У своїй так званій клонально селекційної теорії (селекційної гіпотезеобразовання антитіл) він постулював, що кожна імунна клітина (лімфоцит) несе інформацію, необхідну для утворення специфічного антитіла. У процесі імунної реакції клітини, що виробляють відповідні антитіла, посилено діляться, оберігаючи тим самим організм від проникнення чужорідних елементів. З цього відкриття випливало, що якщо в клітинній культурі виростити потомство лімфоцитів, то можна виділити специфічні речовини, наприклад, антитіла, які надають сильне терапевтичний вплив. Лімфоцити вельми чутливі і швидко гинуть в штучному середовищі. З іншого боку, добре ізвестно, що ракові клітини здатні розмножуватися протягом досить довгого часу. Це обстоятельство було використано аргентинським імунологом Ц.

Мільштейном (С. Milstein) і німецьким вченим Г. Келером (G. Kohler), працюючим в Кембриджі. Їм вдалося домогтися злиття лімфоцитів із злужжисними клітинами мієломи (1975 г). Отримані гібридні клітини (гібридоми) могли виробляти антитіла, і в той же час їх удосталь можна було вирощувати в штучному середовищі. Вибір пухлинних клітин не випадковий. Плазмоцитома відбувається з «юних» плазматичних клітин - з тих клітин, які здатні до синтезу антитіл. Здатність виробляти, а потім і секретувати в кров імуноглобуліни зберігається в пухлинах. Крім того, пухлини виникають з однієї мутантної клітини (пухлина розвивається як клон) і можуть утворювати імуноглобуліни. Технологія отримання моноклональних антитіл зводилася до наступного:

попередньо в організм мишей вводили антиген, викликаючи імунну відповідь;

втягували лимфоїдну клітку, яка продукує відповідні антитіла;

лимфоїдну клітку об'єднували з кліткою пухлини (мієломи);

отримували безперервно ділитися клітинний гібрид (Гібридома), здатний синтезувати антитіла із заданою специфічністю. Зазвичай гібридоми отримують шляхом злиття лімфоцитів, який виробляє антитіла із заданою специфічністю і клітин пухлини лимфоїдної тканини (плазмоцитоми). За своє відкриття вчені в 1984 році були удостоєні Нобелівської премії з фізіології і медицини. Утворені Гібридоми моноклональні антитіла мають схожу молекулярну будову і мають однакову специфічністю. Таким чином, з 1975 року починається епоха створення і використання моноклональних антитіл. В даний час вже створені десятки препаратів моноклональних антитіл успішно застосовуються в клініці при захворюваннях різної етіології. Гібридоми, які синтезують певні види антитіл, відбирають на селективних ростових середовищах. Потім відібрані гібридоми поміщають на культуральне середовище, в якій вони розмножуються і утворюють багато родинних клітин (клон). Такі клони можуть синтезувати антитіла в обмежених кількостях.

II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. Наука, яка на основі застосування знань у галузі мікробіології, біохімії, генетики, генної інженерії, імунології, хімічної технології, приладо- і машинобудування використовує біологічні об'єкти або молекули для промислового виробництва корисних для людини і тварин речовин і продуктів - це ...

а) біотехнологія;

б) анатомія;

в) морфологія;

г) систематика;

д) екологія.

2) Об'єктами біотехнології є ...

а) віруси, бактерії, гриби, протозойні організми, клітини (тканини) рослин, тварин і людини, речовини біологічного походження, молекули;

б) рослини і їх тканини і органи;

в) мікроорганізми і продукти їх життєдіяльності;

г) новітні технології (нанотехнології);

д) весь світ.

3) Рівні, на яких проводяться дослідження в біотехнології рослин ...

а) клітинний і молекулярний;

б) молекулярний і атомарний;

в) клітинний і тканинний;

г) нано рівень;

д) мікрорівень.

4) рекомбінантов - це ...

а) організми, отримані методами генетичної інженерії;

б) видозміни хромосом;

в) гени, отримані методами генетичної інженерії;

г) різновид природної мутації;

д) каліцтва.

5) Процес штучного створення біологічного об'єкта - це ...

а) зміна його генетичної інформації з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;

б) зміна його зовнішнього вигляду з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;

в) зміна його генетичної інформації з метою створення нових організмів;

г) зміна його працездатності з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;

д) зміна його фізіологічних функцій з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості.

б) Одне з головних напрямків біотехнології -

а) виробництво біологічно активних сполук, лікарських препаратів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;

б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;

в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;

г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;

д) створення універсального воїна.

7) Одне з головних напрямків біотехнології -

а) застосування біологічних методів захисту рослин від шкідників і хвороб;

б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;

- в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;
 - д) створення універсального воїна.
- 8) Одне з головних напрямків біотехнології -
- а) створення нових корисних сортів рослин;
 - б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;
 - в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;
 - д) створення універсального воїна.
- 9) Біотехнологія рослин заснована на ...
- а) використання культивованих *in vitro* клітин рослин;
 - б) використанні культивованих *in vitro* клітин тварин;
 - в) використанні культивованих *in vitro* клітин мікроорганізмів;
 - г) створенні нових сортів рослин;
 - д) створення універсального рослини.
- 10) Чому для створення клітинних технологій використовують культивовані клітини рослин?
- а) вони зберігають здатність синтезувати вторинні метаболіти;
 - б) вони здатні синтезувати нові речовини;
 - в) вони набувають здатність синтезувати нові речовини;
 - г) вони добре регенірують;
 - д) вони здатні вижити в таких умовах.
- 11) Тотипотентність - це ...
- а) особливість культивованих клітин регенерувати *in vitro* цілу рослину;
 - б) вони здатні синтезувати нові речовини;
 - в) вони набувають здатність синтезувати нові речовини;
 - г) вони добре регенірують;
 - д) вони здатні вижити в таких умовах.

III. Обговорення теоретичних питань:

1. У чому переваги використання рослин як продуцентів фармацевтичних субстанцій?
2. Класифікація вторинних метаболітів рослин.
3. Що являє собою калусних тканину і які умови її вирощування?
4. Вплив умов вирощування суспензійних культур (температура, рН, світло, аерація і ін.) На клітини рослин.
5. Вплив складу живильного середовища на біосинтез вторинних метаболітів рослин.

6. Яка роль фітогормонів і стимуляторів росту при вирощуванні клітин рослин?
7. Охарактеризуйте основні фази розвитку клітин рослин в суспензійній культурі.
8. Які особливості необхідно враховувати для отримання культури рослин з високим потенціалом біосинтезу активних компонентів?
9. Опишіть вплив асептики при виробництві фармакологічно активних субстанцій з культури рослин і методи стерилізації вихідного рослинного матеріалу.
10. Що являють собою алкалоїди та приведіть систему їх класифікації?
11. Які основні лікарські форми алкалоїдів і серцевих глікозидів?
12. Яким чином проводять отримання алкалоїдів?
13. Привести методи виробництва алкалоїдів на прикладі отримання таксанов.
14. Описати основні принципи роботи для отримання генно-інженерних рослин.
15. Які переваги у трансгенних рослин як продуцентів фармацевтичних субстанцій?
16. Що потрібно для створення ефективних генних конструкцій?
17. Охарактеризувати методи введення генної інформації в клітку.
18. Продукти трансгенних рослин: мукозальні вакцини і моноклональні антитіла.

Теми доповідей/ рефератів

1. Технологічний режим вирощування рослинних клітин. Біореактори.
2. Методи іммобілізації в технології вирощування рослинних клітин
3. Визначення калусних культур (отримання каллуса, особливості живильного середовища, стадії отримання біомаси, переваги калусних і суспензійних культур)

4. IV. Підведення підсумків

5.

6. Список рекомендованої літератури

1. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
2. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
3. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
4. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.

5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1. –