ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____ (Борисюк І.Ю.)
“ 27“ серпня 2021 р

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
з самостійної роботи студентів (СРС)

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Тема №1 **«Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин.»**

для аспірантів

Методичні рекомендації з СРС розробив:
асистент

_____ (Акішева А.С.)
підпис

Методичні рекомендації з СРС обговорено на методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: «Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин»

Мета: ознайомитися з методами генної інженерії за допомогою яких стало можливим створювати нові типи рослин, в тканинах яких можуть синтезуватися і накопичуватися білки з різних гетерологічних систем.

Основні поняття: каллус, ауксин,цитокіни.

План

І. Теоретичні питання до заняття:

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: висвітлення, температура, аерація, перемішування середовища та ін. Калусних клітини, при тривалому культивуванні, можуть спонтанно купувати гормононезалежний, 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 гормононезалежний зростання). Такі каллусов називають «звикла» тканиною. Прикладом гормононезалежний штаму може бути штам К-27 зміїної (Rauwolfia serpentine Benth), отриманої шляхом обробки тканин клітинної 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) .Каллусная 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, тобто 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 диференційованої 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 ауксинамі і цитокининами. 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, тобто при підготовці до мітозу або мейозу, необхідні цитокініни. Залежно від концентрації фітогормони викликають утворення каллуса різних типів. Каллус має аморфну масу, що складається з тонкостінних паренхімних клітин, які не мають суворої анатомічної структури. Колір може бути білим, жовтим, зеленим, пигментированним 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 2,4-Д (2,4-дихлоро-феноксіуксусная кислота) каллусов стають пухкими і втрачають пігментацію.

Каллус першого типу використовують для отримання суспензійних культур, другого типу - для підтримки зростання клітин і збереження культури в зростаючому стані. У интактном рослині більшість спеціалізованих клітин не діляться, за винятком клітин, спеціалізація яких спрямована на розподіл. Процес втрати клітинної спеціалізації називають дедіференціровкой. Перший етап дедіференціровкі для неделящихся спеціалізованих клітин рослин це відновлення здатності ділення. Частини рослини (органи, тканини, клітини) в порівнянні з клітинами тварин більш автономні, що пов'язано з тотипотентностью рослинних клітин. Проявом тотіпотентності є здатність рослин до регенерації з одиничних клітин. Припускають, що чим менше спеціалізована клітина, тим легше вона буде дедіференціюватися. Найбільш детально процес дедіференціровкі і каллусообразованія вивчений на культурі тканин на дисках з різних зон коренеплоду моркви, бульби топінамбура і серцевини паренхіми стебла тютюну. Встановлено, що дедіференціровка спеціалізованих клітин починається з використання запасних поживних речовин, руйнування спеціалізованих клітинних органел: хлоро, хромо- і 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 тотипотентність. 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 стеблового 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, сукціндегідрогенази і других.Такім чином, основні особливості вихідної тканини при отриманні від неї перевіваемих клітинних культур тривало зберігаються, що пояснюється стійким збереженням стану репресії або дерепрессии генів. Рослини завжди служили людині як джерело їжі, ефірних масел, барвників і лікарських сполук. Так, мак снодійний (Papaver somniferum) є джерелом болезаспокійливого 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 виявилося справедливим. Але в

окремих випадках клітини або не проявляли здібності до синтезу необхідних речовин, або синтезували їх у мінімальній кількості. Знадобилися довгі експерименти по підбору 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:

1-відбирати рослини, в яких вміст біологічно активних речовин максимально в порівнянні з іншими особинами цього виду;

2-для ініціації культури тканини необхідно використовувати органи рослин, в яких відбувається синтез і накопичення даних речовин, що дозволить урізноманітнити і збагатити склад продуцентів;

3-прі 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 мікро-елементів;

- наявність у складі живильного середовища вітамінів і амінокислот, які сприяють синтезу вторинних метаболітів;

- наявність певних типів 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 pH середовища;

-наявність асептики. Найбільш часто використовуються наступні поживні середовища: Середовище Мурасіге -Скуга (універсальне середовище, 1962 г.) - придатна для освіти каллусов, 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 метаболизировать і інші цукру. Однак накопичення вторинних метаболітів в цьому випадку було незначним. Сахара необхідні в якості поживного компонента, тому що 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 аммонія.Налічіе 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 певних типів гормонів і стимуляторів, що підтримують здатність клітин до поділу і стимуляцію синтезу вторинних метаболітів. Основними фитогормонами, що є індукторами і регуляторами синтезу вторинних метаболітів є ауксини (викликають диференціювання клітин експлантов) і цитокініни (індукують клітинний розподіл). 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 фітогормони можуть підвищувати зростання культури і синтез вторинних метаболітів, а в інших приводити до його зниженію.мСтімуляторамі зростання (типу ауксинів) є:

3-індол-оцтова кислота в кількості 0,1-1,0 мг / мл;

-нафтілуксусная кислота -1-2 мг / мл; 2,4-діхлорфеноксіуксусная кислота (2,4-D) -1-2 мг / мл. Стимуляторами росту цитокінінів є: кинетин, 6-бензіламінопурін, аденін в концентраціях 0,2-0,5%. Так само як стимулятора росту рослин за останнім часом запропоновані й інші сполуки, наприклад, мелафен, який представляє собою меламиновую сіль біс (оксиметил) фосфінових кислоти. Так, наприклад, запропоновано використовувати мелафен як регулятора росту для збільшення накопичення берберина в клітинній культурі василистника малого (Thalictrum Minus). Автори провели порівняння ефективності біосинтезу алкалоїду берберина при використанні класичних стимуляторів росту (2,4-D -у концентрації 1 · 10-4г / чи кинетин - в концентрації 5 · 10-4г / л) і мелафена (в концентрації 10-6 · 10 -8г / л). Встановлено, що через 15 діб культивування з мелафеном кількість берберина составляло138,1 мг / л, в той час як при використанні класичних стимуляторів росту -50,1 мг / мл. Таким чином, застосування мелафена призводило до збільшення виходу алкалоідав 2,8 рази. Наявність або відсутність у складі живильного середовища вуглекислого 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, тому що 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 слабкого 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 pH 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 pH на ріст клітин і синтез вторинних метаболітів, наявні в літературі, вельми суперечливі. Величина pH 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 витримування 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 дистильованої 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 суспензійний культури 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 аймаліцина 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 ювенільної фазі розвитку, або речовини, що містилися в клітках філогенетично більш ранніх груп рослин. Так, наприклад, в культурі клітин маку пріцветніковий (Papaver bracteatum) міститься вторинний метаболіт -сангвірін, характерний для ювенільних рослин, і не виявляється тебаин, який синтезується дорослими рослинами. Синтез вторинних метаболітів може корелювати з процесом диференціювання в культурі клітин. Наприклад, в суспензійний культури маку снотворного Papaver somniferumмаксімальний 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 штам-сверхпродуцентов ІФР ДМ-0,5. Всі ці штами зберігали стабільність щодо синтезу фуростанолового 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 клітинах, які не здатні 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, тобто 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 2,4-D, трикратно збільшився синтез антрахинона суспензійний культурою Morinda citrifolia. Дуже великий вплив на зростання суспензійний середовища надає її безперервне перемішування, яке забезпечує достатню аерацію і предотвращаетосажденіе 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 реакцію культури клітин не виникає. Залежно від способу перемішування культуральної рідини біореактори ділять на дві групи:

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

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

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

- проточное культивування - в біореактор постійно додають свіжу живильне середовище, і одночасно відбирають той же обсяг або суспензії (відкрите проточное культивування), або одну відпрацьовану живильне середовище, залишаючи клітини в реакторі (закрите проточное 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 протоки;

-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, тобто приміщення 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 суспензійний культури 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 гидроксилированию, епоксідірованія, глюкозілірованію, етерифікації, а також приєднуватися до амінокислот. Наприклад, культура клітин женьшеню кореневого походження здатна трансформувати

глюкозіліровать) фенольні сполуки - продукти діяльності суспензійний культури клітин кореня женьшеню (Panax ginseng). Культури клітин лободи і картоплі можуть біотрансформуватися индолил-3-оцтової кислоти в индолил-3-ацетил-L-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 недиференційовані суспензійну культуру наперстянки. Іммобілізовані клітини цієї культури здатні довгий час з постійною швидкістю трансформувати □-метілдігітоксін в □-метилдигоксин. Початковим джерелом отримання алкалоїдів є растеніяразлічних сімейств, які ростуть ендемічні в різних странах.Так, наприклад, Раувольфія зміїна (Rauwolfia serpentine Benth) про-ізрастаетв Індії, Бірмі та Африці; Стефанія гладка (Stephania glabra (Roxb.) Miers) - багаторічна тропічна трав'яниста рослина сімейства луносемяннікових - виростає переважно в субтропічних районах, коріння і коренеплоди рослини містять алкалоїди Стефаглабріна (стефарін), циклеанін, пальматин, корідін, гіндарін і ін .; Тис коротколістная (Taxus brevifola) або Тис гострий (Taxus cuspidate) виростає в Кореї, є продуцентом таксол, що володіють високою протипухлинною активністю по відношенню до різних лініях злоякісних клітин, в тому числі і меланомних. Наводимо кілька прикладів культур продуцентів, які накопичують фармакологічно активні вторинні метаболіти:

-алкалоїди барвінку рожевого (Vinca rosea, синонім - Cathazanthus rosea), які активно застосовуються в якості протидії пухлинних 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 синтетичної активності вихідні рослини. Серед них штами, в яких відбулося змішання синтезу в сторону одного з кінцевих метаболітів - серпентину або аймаліціна;

-таксол і інші таксани - вторинні метаболіти, отримані в суспензійний культури тиса (Taxus canadensis), які активно застосовуються в якості протипухлинних препаратів, що надають цитостом-тическое дію на пухлинні клітини; індольні алкалоїди (резерпін, аймалин, аймаліцін, раувольфін, зміїний, іохімбін і ін.), отримані в суспензійний культури зміїної (Rauwolfia serpentine 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» -антіарітміческое засіб, знижує збудливість міокарда, подовжує рефрактерний період, гальмує

внутрішньошлуночкову провідність; «Раувазан», «Іохімбін» -сильніше місцево-анестезуючу речовину, розширює судини шкіри і слизових оболонок, антиметаболит серотоніну застосовується для лікування імпотенції у чоловіків та ін .;

- алкалоїди барбарису, отримані в суспензійний культури (Berberis parvifolia), використовуються для зниження артеріального тиску, підвищення тонусу мускулатури матки;

-алкалоїди маку пріцветніковий (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 суспензійний культурі тканин;

- кардіотропну глікозиди, отримані в суспензійний культури 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;

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

-убіхінони отримують в промислових масштабах з суспензійних культур N. Tabacum. Убіхінон використовуються в медицині і косметології.

Питання для самоконтролю

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, pH, 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 суспензійний 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 серцевихглікозидів?
12. Яким чином проводять отримання алкалоїдів?
13. Привести методи виробництва алкалоїдів на прикладі отримання таксанів.
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: мукозальние вакцини і моноклональні антитіла.

Орієнтовні завдання для опрацювання теоретичного матеріалу

1. *Скласти словник основних понять з теми*
2. *Заповнити орієнтувальну картку для самостійної підготовки студента з використанням літератури з теми*:

Основні завдання	**Вказівки**	**Відповіді**
1	**2**	**3**
Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин.	Розкрити питання	Краснопольский Ю.М.Фармацевтическая біотехнология: Производство биологически активных ве-ществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев –Харьков: НТУ«ХПИ»,Ч.1.2012. – 304с. С. 63

II. Практичні роботи (завдання), які виконуватимуться на занятті

III. Тестові завдання для самоконтролю

1.Для отримання протопластів з кліток грибів використовується
1) лізоцим
2) трипсин
3) «равликовий фермент»
4) пепсин
5) солізим

2. За освітою протопластах з мікробних клітин можна слідкувати за допомогою методу

1) віскозиметрії
2) колориметрии
3) фазово-контрастної мікроскопії
4) електронної мікроскопії

3. Висока стабільність протопластах досягається при зберіганні

1) в холоді
2) в гіпертонічної середовищі
3) в середовищі з додаванням антиоксидантів
4) в анаеробних умовах
5) в середовищі поліетиленгліколю (пег)

4. Для протопластірованія найбільш подходят суспензійного культури в

1) лаг-фазі
2) фазі прискореного зростання
3) логарифмічною фазі
4) фазі уповільненого зростання
5) стаціонарної фазі

5. Візначте категорію нтд:

5. Фармацевтичне підприємство освоює випуск нової продукції. В якому розділі промислового технологічного регламенту описані зовнішній вигляд і фізико-хімічні властивості готового продукту:

A характеристика кінцевого продукту виробництва
B.. Виклад технологічного процесу
C. Характеристика сировини, матеріалів і напівпродуктів
D характеристика допоміжного сировини і матеріалів
E. Інформаційні матеріали

6. В якому розділі регламенту описана санітарна підготовка виробничих приміщень:

A. Опис стадій технологічного процесу і виробнича санітарія
B. Техніка безпеки, пожежна безпека і виробнича санітарія
C. Безпечна експлуатація виробництва та охорона навколишнього середовища
D інформаційні матеріали
E. Загальна характеристика виробництва

7. Вкажіть аналітичний нормативний документ, що встановлює вимоги до складу препарату та процесу його виробництва:

a. Технологічний регламент, фармакопейна стаття
b. Технічний регламент
c. Державний стандарт (гост)
d галузевий стандарт (ост)

e. Технічні умови

8. У промислово-технічному відділі розробляють технічний регламент. На виробництві замінили кілька одиниць обладнання. В який розділ технічного регламенту потрібно терміново внести зміни.

a. Апаратурна схема

b. Розділ охорони праці

c. Таблиця гдк

d план ліквідації аварії

e. Перелік інструкцій

9. На фармацевтичному підприємстві виготовляють різні готові лікарські засоби згідно з технологічними регламентами. Протягом якого терміну промисловий регламент є дійсним:

a 5 років

b. 3 роки

c. 8 років

d. 1 рік

e. 6 місяців

10. Нормативний документ, в якому встановлені вимоги до конкретної продукції та послуг, що регулює відносини між постачальником і споживачем. Який документ відповідає цьому визначенню:

a. Технічні умови;

b. Стандарт;

c. Технічний регламент;

d технологічний регламент;

e. Методичні вказівки.

11. Що не регламентують правила gmp:

a. Вимоги до біологічної доступності препарату;

b. Фармацевтичну термінологію;

c. Вимоги до будівель та приміщень виробництва;

d. Вимоги до персоналу;

e. Необхідність валідації.

12. Витратні коефіцієнт - це:

a. Відношення маси вихідних компонентів до маси готового продукту.

b. Кількість речовини, що використовується для отримання заданої кількості препарату.

c. Відношення маси готового продукту до маси вихідних матеріалів.

d відношення маси матеріальних втрат до маси вихідних матеріалів.

e. Сума мас втрат і вихідного матеріалу

13. Валідація - це поняття, що відноситься до gmp і що означає:

a. Що система працює так, як і передбачалося.

b. Рентабельність підприємства.

c. Контроль за роботою втк підприємства.
d стерильність продукції.
e. Перевірку якості глз.
14. Правила gmp регламентують:
a. Всі відповіді вірні.
b. Фармацевтичну технологію.
c. Вимоги до будівель та приміщень фармвиробництва.
d вимоги до персоналу.
e. Необхідність валідації.
15. Правила gmp регламентують:
a. Проведення доклінічних випробувань фармацевтичних препаратів.
b. Організацію виробництва глз.
c. Проведення клінічних випробувань.
d правила роздрібної торгівлі.
e. Правила оптової торгівлі.
16. Правила gmp регламентують:
a. Проведення клінічних випробувань
b. Організацію виробництва глз.
c. Проведення доклінічних випробувань фармацевтичних препаратів.
d правила роздрібної торгівлі.
e. Правила оптової торгівлі.
17. Матеріальний баланс - це:
a. Співвідношення між кількістю вихідних матеріалів, готової продукції, відходами виробництва і матеріальними втратами.
b. Кількість матеріальних втрат.
c. Співвідношення між кількістю готового продукту і відходів.
d опис технологічного процесу.
e. Співвідношення кількостей енергії, введеної в технологічний процес і виділеної після його закінчення.
18. Виберіть машину для середнього подрібнення рослинної сировини:
a. Траво- і корнерезка
b. Вибрационная млин
c. Барабанна млин
d стрижнева млин
e. Струйная млин
19. При виготовленні розчинів на фармацевтичних підприємствах використовують різне обладнання. Які апарати використовують для механічного перемішування рідин?
a. Лопатеві, турбінні мішалки.
b. Рідинні свистки.
c. Пульсатор.

d реактори.

e. Барботер.

20. При виборі измельчающего обладнання враховують фізико-хімічні властивості матеріалу. Визначити спосіб подрібнення для волокнистого матеріалу з клітинною структурою.

a. Різка, стирання

b. Удар, розколювання, стирання

c. Розчавлювання, удар

d розчавлювання, стирання

e. Удар

21. При виробництві розчинів на фармацевтичних підприємствах використовують різне устаткування. Які апарати застосовуються для механічного перемішування рідин?

a. Лопатеві мішалки

в. Компресори

c. Пульсатор

d рідинні свистки

e. Насоси

22. На фармацевтичному підприємстві застосовуються різні типи сушарок. Які сушарки належать до типу контактних?

a. Вальцевого

b. Стрічкові

c. Повітряно-циркуляційні

d пневматичні

e. Распилітельниє

23. У процесі виготовлення фіто- і органопрепаратів використовують різні види сушарок. Яку сушилку найбільш доцільно використовувати для висушування термолабільних речовин?

a. Ліофільні

b. Вальцевого

c. Стрічкові

d сушильна шафа

e.барабанную

24. Для фільтрування розчинів використовують різну апаратуру. Які фільтри використовують для фільтрування під вакуум:

a. Нутч-фільтри

b. Друк-фільтри

c. Рамні фільтри-преси

d фільтри-мішки

e. Центрифуги

25. Якою має бути правильна комплектація одягу при роботі в «чистих» приміщеннях, відповідно до рекомендації gmp?

A. Комбінезон, шолом, маска, бахіли, рукавички

в. Костюм брюк, маска, бахіли

C. Комбінезон, маска, бахіли, рукавички

D. Костюм брюк, головний убір, рукавички, бахіли

E. Костюм брюк, шолом, бахіли

IV. Індивідуальні завдання для студентів з теми заняття

Підготувати презентації, доповідь за темами:

1.Калусна тканина і умови її вирощування.

2.Алкалоїди та приведіть систему їх клас-класифікацією

3.Основні принципи роботи для отримання генно-інженерних рослин.

4. Продукти трансгенних рослин: мукозальні вакцини і моноклональні антитіла.

6.Рекомендована література:

Основна

1. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.

2. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.

3. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.

4. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.

5. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.

6. 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. –