

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ
ГОНЧАРА
БІОЛОГО-ЕКОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ**

В.Г. ГАВРИЛЮК, Т.В. СКЛЯР, Н.В. КУРАГІНА

БІОМЕДИЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт і організації
самостійної роботи студентів

2024

УДК: 57.01/579.2

Рекомендовано до друку кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології біологічного факультету ДНУ ім. О.Гончара, протокол № 13 від 04.03.2024	Ухвалено вченою радою біолого-екологічного факультету ДНУ ім. О. Гончара, протокол №9 від 18.03.2024р
---	---

Автори:

Гаврилюк Вікторія Григорівна – к.б.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Скляр Тетяна Володимирівна – к.б.н., доцент, завідувач кафедри мікробіології вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Курагіна Ніна Володимирівна – к.б.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Рецензенти:

Шарамок Тетяна Сергіївна – к.с.-г.н., доцент, завідувач кафедри загальної біології та водних біоресурсів Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Хоменко Олена Миколаївна – к.б.н., доцент кафедри біохімії та фізіології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Гаврилюк В.Г., Скляр Т.В., Курагіна Н.В. Біомедичні технології. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт і організації самостійної роботи студентів/Гаврилюк В.Г., Скляр Т.В., Курагіна Н.В. – Дніпро, Вид-во Дніпровського національного університету, 2024, 46 с.

В даній роботі наведено рекомендації щодо виконання лабораторних робіт та організації самостійної роботи студентів, метою яких є опанування студентами сучасних знань з технології виробництва біомедичних препаратів для діагностики, терапії та специфічної профілактики інфекційних і неінфекційних захворювань людини.

Методичні рекомендації мають науково-практичне значення і можуть бути використані викладачами та студентами на практичних і лабораторних заняттях.

Для підготовки магістрів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

©Гаврилюк В.Г., Скляр Т.В., Курагіна Н.В. Біомедичні технології. 2024

© Вид-во ДНУ ім. О. Гончара, 2024

Зміст

Лабораторна робота № 1. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КЛІТИН <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	4
Лабораторна робота № 2. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ ТА ЕЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ	8
Лабораторна робота № 3. МЕТОД ПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ	11
Лабораторна робота № 4. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ	13
РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ	17
Тема 1. Технології рекомбінантних ДНК – генотерапія, генодіагностика	17
Тема 2. Клітинні технології – клітинна терапія, тканинна інженерія	20
Тема 3. Біосенсори та біочіпи	25
Тема 4. Наномедицина	27
Тема 5. Рекомбінантні білки людини	28
Тема 6. Моноклональні антитіла в терапії та діагностиці	32
Тема 7. Біотехнологія ферментів	34
Тема 8. Технології виробництва антибіотиків	36
Тема 9. Пробіотики	41
Тема 10. Виробництво та застосування вакцин	44
Перелік питань для самостійного опрацювання матеріалу з дисципліни «Біомедичні технології»	46
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	47

Лабораторна робота № 1

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КЛІТИН *BACILLUS SUBTILIS*

Мета: засвоїти метод трансформації клітин *Bacillus subtilis*

Матеріали та обладнання: глюкозо-сольове середовище Спіцайзена, донорський штам *B. subtilis* SH₉W – прототроф. Реципієнт – штам *B. subtilis* TM – ауксотроф, залежний від метіоніну (*met*, *try*).

Основне середовище – глюкозо-сольове середовище Спіцайзена з таким складом (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 2; KH₂PO₄ – 6; K₂HPO₄ – 14; MgSO₄ – 0,1; цитрат натрію – 1; глюкоза – 5; агар-агар – 25 (для твердих середовищ). Стерилізують автоклавуванням при 0,5 атм. 30 хв. Розчин амінокислот готують на дистильованій воді з концентрацією 2 мг/мл. Після стерилізації кип'ятінням додають 1 мл на 100 мл середовища. Кінцева концентрація – 20 мкг/мл.

Розчини для отримання та очищення ДНК:

- розчин 1: 0,15М NaCl, 0,1М версен, рН 8,0;
- розчин 2: 0,015М NaCl, 0,0015М цитрат натрію;
- розчин 3: 1,5М NaCl, 0,15М цитрат натрію.

ПАСК (парааміносаліцилова кислота). Готують 24%-й розчин на дистильованій воді, додають 1/3 об'єму лізату. Кінцева концентрація – 6%.

80%-й фенол: за 1-2 доби до використання фенол переганяють, плавлять на водяній бані перед дослідом і насичують водою до 80%. Фенол, який перегнали, слід зберігати в темному місці, аби запобігти утворенню перекисів.

Примітка. Молекулярна вага NaCl дорівнює 58,5 г/моль; цитрату натрію – 212 г/моль; версена 372,2 г/моль; MgCl₂ – 94,3 г/моль.

Основні відомості

Характеристика процесу трансформації бактерій.

Генетична трансформація – широко відомий феномен передачі ознак одного бактеріального штаму клітинам іншого за допомогою ізольованої ДНК (трансформуючий фактор). Відкриття природи трансформуючого фактора стало найпершим і найяскравішим доказом генетичної ролі ДНК.

Генетична трансформація описана для ряду бактерій, але *Bacillus subtilis* є зручним об'єктом для генетичних експериментів завдяки здатності рости в мінімальному середовищі.

Трансформувати можна тільки ті бактерії, у клітини яких може проникати високомолекулярна дволанцюгова інтактна ДНК. Такі клітини називаються компетентними. Стан компетентності залежить від фізіологічного стану клітин бактерій: вона найвища в середині експоненційної фази росту. Компетентність клітин можна підвищити, обробляючи їх хлоридом кальцію або циклічним аденозинмонофосфатом.

Процес трансформації, починаючи з моменту додавання ДНК з клітин донорського штаму до культури реципієнта, включає такі стадії:

1. Адсорбція ДНК реципієнтною клітиною. На цьому етапі трансформуючий фактор чутливий до ДНК-ази.

2. Проникнення ДНК у клітину. ДНК вже не чутлива до ДНК-ази. Встановлено, що ДНК може поглинатись тільки тими клітинами, які

знаходяться в стані компетентності. Більшість клітин у популяції стають компетентними в певній фазі розвитку культури, при цьому стан компетентності пов'язаний з певною стадією росту культури бактерій.

3. Інтеграція частини ДНК у хромосому реципієнтної клітини. Генетична рекомбінація здійснюється шляхом обміну одониткових фрагментів ДНК.

4. Поява рекомбінантів (трансформантів) після репарації: реплікація рекомбінантної ДНК і поділу реципієнтної клітини.

Генетична трансформація відбувається в природних умовах, є одним із механізмів парасексуального процесу у мікроорганізмів.

*Експериментальне дослідження процесу трансформації *Bacillus subtilis*.*

1. Вирощування клітин донора – прототрофного штаму *B. subtilis* SHgW

Чашки з МПА (м'ясопептонний агар) засівають суспензією добової культури. Культуру найкраще вирощувати до середини або до кінця лаг-фази, тому що в цей час проростають усі спори, які потрапили в середовище, а нові не встигли з'явитись. Штами інкубують при 37°C 16-18 год, потім змивають з чашок охолодженим розчином 1. Суспензію центрифугують при 3-5 тис. об/хв 20 хв, ресуспендують у розчині 1 і знову центрифугують у тому ж режимі. Для отримання 3-3,5 г біомаси (волога вага) для роботи слід взяти 8-10 чашок з 25-30 мл середовища.

Відмиту культуру суспендують у розчині 1: 1 г біомаси на 5-6 мл розчину. Суспензію клітин донора заморожують у холодильнику в ступці.

2. Виділення ДНК із донорського штаму

Отримання ДНК із бактерій починають з того, що клітини руйнують, розбиваючи заморожену суспензію в ступці. Потім культуру *B. subtilis* розморозжують на водяній бані при 37°C, постійно перемішуючи скляною паличкою. Додають лізоцим, розчинений у розчині 1. Кінцева концентрація його повинна дорівнювати 250-500 мкг/мл. На 1 г біомаси припадає 1,25 - 2,5 мг лізоциму. Суспензію з лізоцимом витримують на водяній бані при 30° С протягом 40 – 50 хв, періодично перемішуючи. По закінченні інкубації суміш стає в'язкою, напівпрозорою. До лізату додають розчин ПАСК до кінцевої концентрації 6%, або додецилсульфат натрію (ДДС) до 1%. В'язкість розчину після цього збільшується.

3. Депротеїнізація

До лізату додають такий самий об'єм свіжеперегнаного фенолу. Струшують 45-60 хв на шутелі (качалці) при кімнатній температурі, у результаті чого виходить молочно-біла емульсія. Її центрифугують при 5 тис. об/хв 10-15 хв. Утворюються два шари: верхній – водяний, опалесцюючий, у ньому розчинена ДНК, нижній – фенольний. Між ними – проміжний шар денатурованого білка. Водяний шар відбирають піпеткою з відпиляним носиком, щоб ДНК не розривалась в результаті гідродинамічних сил. Слід приєднати до піпетки шланг і відбирати рідину з поверхні, намагаючись не захопити проміжний шар. Нижній шар відокремлюють. Для видалення ліпідів і вуглеводів, а також залишків фенолу водяний шар змішують з таким самим об'ємом медичного ефіру, закривають і сильно струшують 3-5 хв. Одержану

емульсію центрифугують при 4-5 тис. об/хв 10-15 хв. Нижній прошарок водяний, верхній – ефірний, між ними залишки білка й інші домішки. Водяний шар, у якому знаходиться ДНК, відбирають, пропускаючи піпетку крізь інші прошарки й намагаючись не захопити осад із дна.

Обробка ефіром повторюється 2-3 рази. Після цього розчин ДНК стає прозорим, в'язкість його трохи зменшується.

4. Осадження ДНК із розчину

Подвійний об'єм охолодженого 96% етилового спирту доливають дуже тонким струменем (або по стінці склянки) у розчин ДНК, перемішують рідину скляною паличкою круговими рухами. Утворені нитки ДНК намотують на паличку, віджимають рідину, промивають спиртом, обсушують на повітрі й додають до розчину 2. Об'єми розчину залежать від припустимої кількості ДНК. При виділенні ДНК з 3 мл культуральної суспензії необхідно взяти 15-20 мл розчину. ДНК обережно розчиняють, “розмотуючи” її по стінках склянки, не прикладаючи багато зусиль, аби не порвати молекули нуклеїнової кислоти. Розчинення триває 24-48 год. Пробу слід зберігати в холодному місці. З 1 г біомаси *B. subtilis* вихід ДНК становить приблизно 2-2,5 мг.

5. Зберігання ДНК

Зберігати розчини ДНК найкраще в концентрації 1,5-2 мг/мл. Розчиняти ДНК легше в низькомолекулярному розчині 2, але потім необхідно підвищити його молярність у 10 разів, додаючи розчин 3, маючи на увазі, що ДНК краще зберігається у високих концентраціях та при високій молярності розчинів. Розчин ДНК зберігають у холодильнику, але треба слідкувати, щоб він не замерз, тому що можуть розриватись нитки молекул нуклеїнової кислоти.

6. Отримання компетентних клітин

Добовою культурою ауксотрофного штаму *B. subtilis* ТМ (met, try) засівають рідке середовище Спіцайзена, яке містить необхідні амінокислоти. Для запобігання появи ревертантів слід регулярно протягом тижня пересівати культуру на мінімальному середовищі з необхідними амінокислотами. Змивання з косяка роблять середовищем Спіцайзена. Засівають середовище так, щоб густина за ФЕКом (фільтр Ю) початкового посівного середовища становила 0,3-0,35 од. При цьому число життєздатних клітин сінної палички повинно дорівнювати $(1-1,2) \times 10^8$ кл/мл. Культивування триває до оптичної густини 1,8 – 2 (4-5 год) Після цього культуру розводять голодним середовищем Спіцайзена (без амінокислот) 1:2, яке містить 0,5% глюкози і підігріте до температури 37-38°C. Підрощують ще 90 хв на шутелі. У цей період компетентність клітин найбільша. У процесі зберігання компетентність клітин різко зменшується. Культуру слід зберігати в замороженому стані не більше 7 діб при температурі -20° С. Заморожують її так: до компетентної культури додають простерилізований гліцерин до концентрації 12% (за об'ємом). Культуру розливають по 2,5-5 мл у пробірки й ставлять у морозильну камеру при температурі -20° С і нижче. Заморозку добре здійснювати і в рідкому азоті. Розморожування проводять на водяній бані при 34-35°C, використовуючи культуру для трансформації без зволікання. Для

підвищення компетентності культури додають стерильний альбумін до кінцевої концентрації 0,5%.

7. Постановка дослідів із трансформації

Усі операції необхідно здійснювати, дотримуючись стерильності. Посуд повинен бути хімічно чистим, стерильним. ДНК і альбумін розливають у цукрові пробірки перед додаванням компетентних клітин, тому що останні дуже швидко втрачають компетентність. Розчин ДНК та бактеріальну суспензію компетентних клітин змішують у рівних об'ємах (у цьому випадку по 0,25мл).

Концентрація ДНК повинна бути невисока – 1-2 мкг/мл. Кінцева кількість ДНК у пробірці в зв'язку з розведенням суспензією буде відповідно 0,5-1 мкг/мл. Це область, у якій концентрація ДНК перестає бути насиченою і починається лінійна залежність числа трансформантів від концентрації ДНК.

Суміш ДНК з компетентними клітинами інкубують 30 хв при температурі 34-36° С. Оскільки порівняно невеликі температурні коливання можуть сильно вплинути на результати трансформації, найкраще інкубувати пробірки у водяному ультратермостаті. Через 30 хв у всі пробірки додають розчин ДНК-ази у 0,05М хлористому магнії для руйнування ДНК, яка не потрапила в клітину. Слід брати розчин ДНК-ази в концентрації 1 мг/мл і додавати по 0,1 мл у пробу, кінцева концентрація ДНК-ази – 150 мкг/мл. Вона гарантує повну інактивацію позаклітинної ДНК. Пробірки витримують ще 5 хв при 37° С . Роблять висів бактерій по 0,2 мл на чашки Петрі з мінімальним середовищем (без амінокислот) за табл.6.

Таблиця 1 Залежність числа трансформантів від концентрації ДНК

№ п/п	Суміш бактерій, мл	Концентрація ДНК, мкг/мл				Розчин NaCl 0,85%	ДНК-аза в 0,05М MgCl ₂ , мкг/мл
		5	0,5	0,25	0,1		
1	0,25	0,25	-	-	-	-	0,1
2	0,25	-	0,25	-	-	-	0,1
3	0,25	-	-	0,25	-	-	0,1
4	0,25	-	-	-	0,25	-	0,1
5	0,25	-	-	-	-	0,35	-
6	-	0,25	-	-	-	0,35	-

8. Висів трансформантів

Для того щоб отримати колонії трансформованих клітин (рекомбінантів, здатних рости у відсутності певних амінокислот, тобто прототрофів), висів роблять на агаризоване середовище Спіцайзена. Попередньо середовище розливають товстим шаром (30-35 мл у чашку Петрі). Чашки із середовищем підсушують 3-4 год у термостаті при 37° С. Підсушені чашки нумерують згідно зі схемою дослідів, потім вносять у кожен по 0,2 мл суміші трансформантів і розтирають шпателем по поверхні агару. Роблять не менше двох “паралельних” висівів із кожної проби. Якщо припускається, що

трансформантів може бути багато, то суміш перед посівом розводять фізіологічним розчином у 10 і більше разів.

Трансформанти ростуть на мінімальній середовищі довше, ніж на МПА і їх колонії набагато менші. Тому підрахунок краще проводити на другу добу. Діаметр колонії до цього часу коливається від 1 до 3 мм. Колонії трансформантів, особливо на самому початку їх зростання, менші від звичайних колоній сінної палички. Колонії трансформантів зручно підраховувати під біноклярною лупою, проколюючи кожну колонію кінчиком пастерівської піпетки змоченої в чорнилі. Оптимальна кількість колоній на чашці Петрі дорівнює 150-200 і не повинна перевищувати 400.

У *B. subtilis* постійно спостерігається явище мікробної дисоціації. Ця група мутацій, що виявляються в популяції, доволі часто впливає на форму, консистенцію та розмір колоній. У більшості випадків у мутантів змінюються властивості поверхневих шарів клітини, що зумовлюють зміну вигляду колоній. Колонії з нерівними краями, які важко розтерти до гомогенної суміші, називаються R-формами. Колонії S-форм гладенькі, при рості на рідкому середовищі дають рівномірне помутніння. В цих умовах легко отримати гомогенну суміш. Хоч обидві форми колоній здатні до трансформації, як реципієнти й донори ДНК, краще використовувати S-форми. Тому перед трансформуванням слід висіяти штам *B. subtilis* TM на мінімальне середовище з необхідними амінокислотами, відібрати S-колонії і всю подальшу роботу проводити з їх нащадками.

Завдання:

1. Виростити біомасу прототрофного штаму *B. subtilis* SHgW.
2. Одержати трансформуючу ДНК.
3. Отримати компетентні клітини *B. subtilis* TM (met, try).
4. Провести досліди з трансформації.
5. Висіяти і порахувати трансформанти.

Контрольні питання:

1. Явище трансформації бактерій в природі та причини й фактори його виникнення.
2. Характеристика основних етапів отримання трансформуючого фактора.
3. Способи отримання компетентних клітин.
4. Оцінка значення генетичної трансформації для генетичних та біотехнологічних досліджень.

Лабораторна робота № 2

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ ТА ЕЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ

Мета: засвоїти методи полімеразної ланцюгової реакції та електрофорезу в агарозному гелі.

Матеріали та обладнання: для проведення ПЛР: досліджувана ДНК; Taq-полімераза – термофільна ДНК-полімераза, виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, що мешкають у гарячих джерелах і тому стійких до дії високих температур; дезоксирибонуклеотиди: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ; два

праймери до IFN- γ – олігонуклеотиди довжиною 20-30 п.н.; буферний розчин з Mg^{2+} ; ампліфікатор ДНК – програмований термостат, який дозволяє задавати температурний режим, час, кількість циклів; піпетки; наконечники для піпеток одноразові; еппендорфи;

для проведення електрофорезу в агарозному гелі: ТАЕ-буфер; агароза, дистильована вода; 1%-ний розчин EtBr розчин, що при освітленні ультрафіолетовими променями флюоресціює оранжевим кольором, (при зв'язуванні з ДНК інтенсивність флюоресценції збільшується приблизно в 20 разів); маркер молекулярних мас ДНК; ванна для електрофорезу; трансільюмінатор; автоматичні піпетки; одноразові наконечники для піпеток.

І Полімеразна ланцюгова реакція

Основні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція є універсальним методом синтезу великої кількості досліджуваної послідовності ДНК. В теперішній час існують різноманітні види та розроблено безліч методик проведення ПЛР, що застосовуються при вирішенні різних задач. Серед них виділяють ПЛР зі зворотною транскрипцією, асиметричну ПЛР, ПЛР в реальному часі, віртуальну ПЛР (ПЛР *in silico*). В клінічній діагностиці за допомогою ПЛР можливе проведення:

1. Ідентифікації вірусної та бактеріальної ДНК в складі ДНК людини.
2. Пренатальної діагностики спадкових захворювань.
3. Виявлення гетерозиготних носіїв дефектних генів.
4. Ідентифікації дефектних генів, що порушують регуляцію проліферації клітин і викликають розвиток онкологічних захворювань.
5. Аналізу та ідентифікації дефектних генів, що містять дуже деградовану ДНК (при судовій експертизі – ідентифікація особистості).
6. Генетичного картирування.
7. Аналізу рівня транскрипції.

Основні етапи полімеразної ланцюгової реакції

I. Денатурація ($94^{\circ}C$): на цій стадії відбувається руйнування водневих зв'язків між двома ланцюгами молекули ДНК. Температура денатурації підбирається з урахуванням наступних задач – «добре» денатурувати матрицю, не пошкодити матрицю й Таq полімеразау.

II. Відпалювання ($57^{\circ}C$): стадія приєднання праймерів до одноланцюгової матриці ДНК. Звичайно вибирають температуру відпалювання на $1-5^{\circ}C$ менше, ніж температура плавлення олігонуклеотидів.

III. Елонгація ($72^{\circ}C$): процес синтезу другого ланцюгу ДНК від 5' до 3' кінця, використовуючи праймер в якості затравки.

Кількість циклів звичайно становить 25-35.

Стадія пост-ПЛР: декілька додаткових (2-5) циклів без денатурації: тільки відпалювання та елонгація, що забезпечують перетворення деякої залишкової кількості одноланцюгових матриць у дволанцюгові.

Принцип методу: ПЛР дозволяє вибірково синтезувати *in vitro* невеликі фрагменти ДНК довжиною від декількох десятків до декількох сотень пар

нуклеотидів, завдяки стадіям денатурації, відпалювання та елонгації, що чергуються.

Завдання:

1. Приготувати суміш реагентів для ПЛР-дослідження за схемою:

<i>Реагенти:</i>	<i>Об'єм на одну пробу:</i>
прямий праймер (10 мкМ)	0,36
зворотний праймер (10 мкМ)	0,36
буфер	1,2
дНТФ (2,5 мМ)	0,8
MgCl ₂ (25 мМ)	0,8
Taq-полімераза	0,1
H ₂ O	7,4

2. Додати до суміші реагентів для ПЛР-дослідження зразок досліджуваної ДНК в об'ємі 1,1 мкл (в концентрації 50-80 нг/мкл).

3. Запрограмувати ампліфікатор.

Контроль результатів ампліфікації проводиться за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

II Електрофорез ДНК в агарозному гелі

Основні відомості

Електрофорез в агарозному гелі з використанням бромистого етидію (EtBr) дозволяє легко виявити ампліфіковану ДНК і визначити її розмір.

Принцип методу полягає в розділенні ДНК різної маси за допомогою електричного струму. Так як молекула ДНК має в своєму складі велику кількість негативно заряджених фосфатних груп, то це сприяє її руху в сторону анода. Розподіл макромолекул залежить від двох перемінних: заряду та маси. Лінійна дволанцюгова ДНК переміщується через матрикс гелю зі швидкістю, що зворотно пропорційна молекулярній масі ДНК. Більш великі молекули ДНК будуть переміщуватись повільніше, внаслідок їх більшого опору тертя.

Завдання:

1. Приготувати агарозний гель. Для приготування об'ємом 100 мл потрібно змішати 2 мл 50xTAE-буфера і 98 мл води, додати туди 1,5 г агарози. Потім розігріти суміш у мікрохвильовій печі до однорідного стану та зникнення міхурців. Трохи охолонути й додати 8 мкл бромистого етидію.

2. Залити в ванночку для електрофорезу, попередньо встромивши туди гребінку для формування лунок.

3. Залити 1xTAE-буфером.

4. Розкапати маркер молекулярних мас ДНК й зразки в лунки, попередньо пофарбувавши зразки бромфеноловим синім.

5. Включити пристрій на 30 хв при U=150 мВ/см.

6. Після електрофорезу помістити отриманий гель в транслюмінатор для одержання результатів.

Після візуалізації результатів електрофорезу за допомогою транслюмінатора отримують картину розподілу ДНК за масою.

Контрольні запитання:

1. Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції, основні етапи, умови, вибір праймерів для ампліфікації.
2. Модифікації методу ПЛР і особливості використання ПЛР в лабораторній діагностиці й медико-біологічних дослідженнях.
3. Правила організації й порядок проведення досліджень в ПЛР-лабораторії.
4. Можливі похибки при проведенні ПЛР.
5. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР.
6. Фактори, що впливають на чутливість й специфічність ПЛР.
7. Сучасні модифікації ПЛР-аналізу.
8. Перспективні напрямки застосування ДНК-діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції.
9. Принцип роботи гель-електрофорезу.
10. Вплив компонентів електрофорезу на хід реакції.
11. Класифікації різних типів електрофорезу.
12. Області застосування гель-електрофорезу.

Лабораторна робота № 3

МЕТОД ПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ

Мета: визначити наявність бактерій роду *Mycoplasma* в біологічному матеріалі за допомогою методу імунофлюоресценції.

Матеріали та обладнання: клінічний матеріал, одержаний від хворих; моноклональні антитіла, мічені ФІТЦ; метанол (або ацетон); монтувальна рідина (у наборі з антитілами); дистильована вода; волога камера; предметні та покривні скельця; люмінесцентний освітлювач, мікроскоп «Біолам».

Основні відомості

Реакція імунофлюоресценції базується на здатності імуноглобулінів незворотно зв'язуватись з флюоресцентними барвниками (флюорохромами) без втрати антитільної активності й здатності зв'язувати антигени. Імунні комплекси, що утворились при зв'язуванні антигенів міченими антитілами, виявляють за допомогою люмінесцентного мікроскопа. При опроміненні короткохвильовим світлом (ультрафіолетовим, фіолетовим, синім) виявляється специфічне люмінесцентне світіння, наприклад, ізотіюціонат флюоресцеїну дає зелено-жовте забарвлення, інші флюорохроми – інші люмінесцентні кольори. Методи імунофлюоресценції мають значні переваги: дозволяють швидко визначити різноманітні антигени (вірусні, бактеріальні, тканинні, внутрішньоклітинні) у дуже малій кількості; на одному предметному склі можна виявити антитіла до декількох різних антигенів; при виявленні тканинних і внутрішньоклітинних антигенів можна встановити їх локалізацію. Методи флюоресценції застосовуються також для виявлення антигенів на поверхні живих клітин. Існує декілька варіантів реакції імунофлюоресценції: метод прямої імунофлюоресценції, метод непрямой

імунофлюоресценції, непрямий флюоресцентний метод зі зв'язуванням комплементу.

Метод прямої імунофлюоресценції призначений для прямого виявлення збудників у зразках клінічного матеріалу, взятих від пацієнтів.

Завдання:

1. Клінічний матеріал, одержаний від хворих, зафіксувати метанолом або охолодженим ацетоном протягом 5-10 хв. До фарбування препарат можна зберігати за температури -20°C протягом місяця.

2. На прогрійтій до кімнатної температури препарат нанести 30 мкл розчинених моноклональних антитіл і помістити його у вологу камеру на 15 хв за температури $20-25^{\circ}\text{C}$.

3. Після фарбування препарат промити дистильованою водою протягом 10 с і висушити на повітрі.

4. Одну краплю монтувальної рідини нанести на препарат і накрити його покривним склом. Препарат готовий для мікроскопування.

5. Препарати дослідити із використанням люмінесцентного мікроскопа за збільшенням $\times 200$, $\times 400$ і $\times 900$.

6. Проаналізувати результати спостереження. Під час мікроскопування в люмінесцентному мікроскопі клітини організму забарвлюються в червоно-жовтогарячий або жовтий колір, мікоплазми флюоресціюють яскраво-зеленим кольором.

Під час перегляду препаратів, одержаних з уретри жінок, видно клітини кубовидного або циліндричного епітелію (їх повинно бути не менше 5-10 у полі зору), цитоплазма яких забарвлена в жовтогарячий колір, а ядра – у темно-коричневий. У процесі дослідження зішкрібів, одержаних із цервікального каналу шийки матки, також видно клітини циліндричного епітелію з жовтогарячою цитоплазмою й темним ядром (не менше 10), крім того, часто можна спостерігати елементи крові певної форми (еритроцити у вигляді рівномірно забарвлених у жовтогарячий колір без'ядерних елементів, сегментоядерні лейкоцити у вигляді округлих і витягнутих утворів із сегментованими ядрами й люмінуючою зернистістю цитоплазми), бактерії (які також можуть флюоресціювати), слиз. Необхідно звернути особливу увагу на колір флюоресценції (яблучно-зелений) і локалізацію збудника відносно клітин епітелію.

Препарат не оцінюють: якщо під час мікроскопування в 4 полях зору присутні менше 5 клітин циліндричного або плоского епітелію; клітини епітелію відсутні; у препараті наявні тільки еритроцити; у препараті багато слизу, артефактів, має місце неспецифічна флюоресценція.

Препарат оцінюють у таких випадках. Якщо під час перегляду всього препарату (не менше 10 полів зору за збільшення $\times 900$) виявлено клітини зі специфічною флюоресценцією, результат вважають позитивним. Якщо в ході перегляду всього препарату (не менше 10 полів зору за збільшення $\times 900$) клітини, що специфічно флюоресціюють, не виявлені, результат вважають негативним. Крім того, в 1 полі зору за збільшення $\times 900$ повинно бути не

менше 8-10 клітин циліндричного або плоского епітелію, еритроцитів, лейкоцитів не більше 15-20 у препараті.

Контрольні запитання:

1. Принцип методу прямої імуофлюоресценції, як необхідного етапу в біотехнологічних дослідженнях.
2. Етапи проведення реакції імуофлюоресценції.
3. Значення методу імуофлюоресценції для експрес-діагностики інфекційних захворювань людини.

Лабораторна робота №4 **ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ**

Мета: визначити наявність антитіл до вірусних гепатитів в клінічних зразках методом імуоферментного аналізу.

Матеріали та обладнання: тест-системи «Діагностичні системи (Росія), «VectorBest» (Росія), «Діапроф» (Україна) для виявлення маркерів вірусних гепатитів: А- антитіла до вірусу класу М (анти-НАV Ig); В – поверхневого антигену вірусу (НВ_sAg); антитіла до НВ_cAg спільного для класів М і G (анти-НВ_c) і тільки класу М (анти-НВ_cIg); гепатиту С – антитіла (анти-НСV) і класу М (анти НCV Ig), автоматичні багатоканальні піпетки, спектрофотометр типу Multiscan EX або Уніплан, перемішувач (шейкер), пробірки Eppendorf, дезінфекційні розчини.

Основні відомості

Імуоферментний метод - це різновид імуносорбентного аналізу. В англійській літературі метод імуоферментного аналізу (ІФА) отримав назву ELISA (Enzyme-Linked Imunosorbent Assay). Це імунологічний метод визначення наявності певних антигенів, заснований на ідентифікації комплексів «антиген-антитіло». На сьогодні метод ІФА найбільш поширений у клінічній діагностиці та в епідеміологічних дослідженнях. Він має ряд істотних переваг порівняно з іншими серологічними методами за рахунок високої чутливості й специфічності, можливості одночасного аналізу великої кількості проб, часткової автоматизації системи або в разі необхідності проведення досліджень без додаткового устаткування.

Основний принцип ІФА – специфічне зв'язування антитіла з мішенню. Якщо молекула-мішень являє собою білок, то його очищений препарат звичайно використовують для одержання антитіл, за допомогою яких потім і виявляють дану мішень. Раніше використовували антитіла, що були за своєю природою поліклональними. Розробка та застосування моноклональних антитіл дали змогу значно покращити специфічність ІФА.

Імуноглобуліни (кон'югат), що використовуються в тест-системах, можуть бути отримані на основі антивидових антитіл (наприклад, антитіла кроля проти імуноглобулінів людини) або на основі антитіл проти людських імуноглобулінів певного класу (М, G, А). Залежно від того, які антитіла використовуються, тест-система буде виявляти в досліджуваному зразку або

специфічні антитіла незалежно від їх класу, або антитіла лише певного класу (наприклад, тільки імуноглобуліни G або тільки імуноглобуліни класу M).

Залежно від антигенів усі імуноферментні тест-системи для виявлення антитіл розподіляються на: лізатні – у яких задіюється нативний антиген (лізований або оброблений ультразвуком збудник інфекції, отриманий у культурі); рекомбінантні – у яких використовуються отримані генно-інженерним методом білки-аналоги певних білкових антигенів збудника; пептидні – беруться хімічно синтезовані фрагменти білків. Загальний напрямок розвитку ІФА-діагностикумів – це шлях розвитку від лізатних тест-систем, які прийнято називати тест-системами першого покоління, до рекомбінатних і пептидних. Велике значення має якість очищення рекомбінантних білків. В ідеальному випадку можливе одержання рекомбінантної тест-системи практично зі 100%-ю специфічністю за умов високої чутливості. На практиці цього не завжди вдається досягти, однак специфічність кращих рекомбінантних тест-систем наближається до 100%.

Схема проведення дослідження за методом імуноферментного аналізу включає етапи:

1. Готують підкладку для фіксації досліджуваного зразка.
2. Зразок, призначений для виявлення специфічної молекули або мікроорганізму, фіксують на твердій підкладці, наприклад пластиковій мікротитрувальній плашці, що зазвичай має 96 лунок.
3. До фіксованого зразка додають антитіло, специфічне до маркерної молекули (перше антитіло), потім промивають лунку, щоб видалити молекули першого антитіла, які не зв'язались.
4. Додають друге антитіло, що специфічно зв'язується з першим антитілом і не взаємодіє з маркерною молекулою. До цього антитіла приєднаний фермент (наприклад, лужна фосфатаза, пероксидаза або уреаза), що може каталізувати перетворення незабарвленого субстрату на забарвлений продукт. Промивають лунку, щоб видалити молекули, які не зв'язались.
5. Додають незабарвлений субстрат, що розпізнається та утилізується ферментом.
6. Проводять якісне або кількісне визначення пофарбованого продукту. Результат оцінюється спектрофотометрично або візуально.

ІФА відрізняється від традиційних серологічних реакцій високою чутливістю, економічністю, дозволяє дослідити велику кількість зразків за короткий час. Цю групу методів називають ще твердофазним аналізом, оскільки антигени або антитіла сорбують на твердій фазі – в лунках пластмасових мікропанелей (планшетів), на кульках, ковпачках, смужках (стрипах) тощо.

За допомогою ІФА можна визначити антигени будь-якого збудника і антитіла до них у крові хворих.

Завдання:

1. Підготувати зразки для проведення реакції. Зразки сироваток чи плазми крові до дослідження зберігають за температури 2-8°C не більше 72 год.

Допустимо заморожувати зразки (бажано до температури, нижчої -20°C) не більше 2 разів. Перед початком роботи просвітлюють зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування (режим 3000 об/хв 15 хв). Зразки з азидом натрію, ознаками гемолізу, гіперліпідемії або бактеріального проростання не придатні для аналізу.

2. Підготувати реагенти до аналізу (із розрахунку на 8 лунок), витримуючи компоненти набору до початку аналізу за температури $18-25^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв:

- розчин для промивання: розводять концентрат розчину дистильованою водою у співвідношенні 1:31 (можна зберігати протягом 10 днів при $2-8^{\circ}\text{C}$);

- розчин кон'югата: в чистий флакон відбирають 2 мл розчину для розведення кон'югата й додають 40 мкл концентрату кон'югата. Вміст флакона ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення. Цей розчин готують безпосередньо перед використанням.

- розчин проявника: змішують у чистому флаконі субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) у співвідношенні 1:1. Суміш інтенсивно перемішують. Перед використанням субстрат повинен бути безбарвним: його необхідно захищати від прямого світла та контакту з металами або іонами металів.

3. Провести аналіз визначення маркерів вірусних гепатитів за етапами:

а) специфічна стадія процесу. Перед проведенням аналізу звільняють від упаковки необхідну кількість стрипів, вставляють їх у рамку. Стрипи, не використовувані в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті за температури $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Промивають лунки планшета розчином для промивання (350 мкл розчину на лунку) 1 раз за допомогою промивача, після чого видаляють зайву вологу, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу. У лунки стрипів вносять по 80 мкл розчину для розведення сироваток. Додатково в лунки стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишаючи вільними 5 лунок першого ряду для контрольних проб. У 2 лунки вносять 20 мкл позитивного контролю, а в 3 лунки – по 20 мкл негативного контролю. У процесі внесення контрольних та досліджуваних зразків обережно піпетують суміш. Під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках. Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують за температури 37°C протягом 60 хв. У результаті інкубації утворюються комплекси "антиген-антитіло", якщо сироватки специфічні до антигену, сорбованого на планшеті. По закінченні інкубації видаляють вміст лунок та промивають лунки 4 рази розчином для промивання, щоб видалити незв'язані антитіла сироватки. Потім видаляють зайву вологу, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу;

б) додавання кон'югата. В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югата, що являє собою розчин моноклональних антитіл, кон'югованих із пероксидазою хрому. Накривають стрипи новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 37°C протягом 30 хв. По закінченні інкубації

видаляють вміст лунок та промивають лунки 6 разів розчином для промивання. Видаляють зайву вологу;

в) додавання субстрату. Вносять у лунки стрипів по 100 мкл субстрату. Накривають стрипи новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 18-25⁰ С в темному місці протягом 30 хв. Зупиняють кольорову реакцію внесенням у лунки по 100 мкл стоп-реагенту. Не більше ніж через 5 хв після припинення кольорової реакції визначають оптичну густина в лунках у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм) або одновильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки, яку необхідно передбачити в ході аналізу.

4. Провести облік та інтерпретацію результатів аналізу відповідно до рекомендацій та формул, наведених в інструктивних матеріалах до тест-набору.

Проведення аналізу вважають коректним, якщо значення оптичної густини контрольних зразків відповідає таким показникам. Оптична густина негативного контролю не вище 0,1 оптичної одиниці, оптична густина позитивного контролю не нижче 0,6 оптичної одиниці. Граничне значення оптичної густини розраховують, додаючи до середнього значення оптичної густини негативного контролю константну величину 0,12 у разі визначення антитіл до гепатиту С; константну величину 0,05 – до гепатиту В та константну величину 0,3 – до гепатиту А. Оптична густина граничного значення у випадку визначення антитіл до вірусу гепатиту В розраховують так: $ОГ=(0,5 \times K)-0,13$, де ОГ – оптична густина, К – середнє значення оптичної густини негативного контролю. Виділяють так звану «сіру зону» – зона значень оптичної густини, від граничного значення до значень оптичної густини, менших від граничного значення на 10%. Результати аналізу вважаються негативними, якщо значення оптичної густини досліджуваного зразка менше нижнього рівня оптичної густини «сірої зони», а позитивними, якщо оптична густина досліджуваного зразка більше граничного значення. Зразки, які мають значення в межах «сірої зони», вважаються невстановленими.

В процесі застосування набору дотримуються таких правил безпеки: роботу проводять у спеціально обладнаному приміщенні; працюють у гумових рукавичках; не піпетують розчини ротом; усі стічні розчини обробляють 6 %-м розчином пероксиду водню за кімнатної температури протягом 3 год; усі тверді відходи збирають у спеціальний контейнер і автоклавують протягом 1 год за температури 120⁰С; інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирають 70%-м етиловим спиртом.

Контрольні запитання:

1. Етапи проведення ІФА для діагностики вірусних гепатитів.
2. Оцінка значення методу імуноферментного аналізу в експрес-діагностиці інфекційних захворювань людини.
3. Характеристика ступеню достовірності методу ІФА та його значення для мікробіологічних і біотехнологічних досліджень.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

Мета самостійної роботи: сформувати навички самостійного опрацювання теоретичного матеріалу, підготовки до науково-дослідницької роботи та опанування методів пошуку новітньої інформації з медичних біотехнологій.

В результаті виконання самостійної роботи студенти повинні навчитись самостійно визначати біотехнологічні процеси і продукти, що застосовуються у діагностиці, терапії та профілактиці захворювань; особливості технології отримання основних біомедичних препаратів, які виробляються в Україні та за її межами; проблеми розвитку біотехнологічних методів в медицині та пріоритетні напрямки для їх вирішення.

Самостійна робота виконується з використанням рекомендованої літератури та консультацій викладача за планом:

1. Опанування теоретичного матеріалу з дисципліни «Біомедичні технології» за темами.
2. Виконання контрольних завдань до кожної теми дисципліни.
3. Самопідготовка до виконання лабораторних робіт з дисципліни.
4. Підготовка відповідей на контрольні запитання до лабораторних робіт.
5. Підготовка доповідей за питаннями самостійного опрацювання матеріалу.
6. Підготовка до підсумкового контролю отриманих знань з дисципліни.

Тема 1. Технології рекомбінантних ДНК – генотерапія, генодіагностика

Теоретичні відомості

Генна терапія. Серед більше ніж 15000 відомих захворювань людини більшість (~90%) обумовлена спадковими або набутими генетичними порушеннями. Генна терапія може здійснюватися в системі *in vivo* (тобто генетичний матеріал зазнає змін безпосередньо в організмі пацієнта) або в системі *ex vivo*, коли трансформація та розмноження клітин проводяться поза організмом, а потім клітини знову вводяться в організм пацієнта.

Генетичні причини більшості захворювань залишаються досі нез'ясованими. Однак навіть при моногенних захворюваннях, молекулярна причина яких достовірно встановлена, генна терапія часто утруднена, поперед усе із-за захисних реакцій організму, а також внутрішньоклітинних механізмів контролю, спрямованих проти чужорідних нуклеїнових кислот. Все різноманіття варіантів генної терапії зведено до трьох основних стратегічних підходів: 1) рекомбінація дефектного гена з введеною кДНК, що призводить до вбудовування «здорової» копії гена замість дефектної; 2) виключення гена через введення антисенсної РНК; 3) репарація дефектного гена із застосуванням химерних конструкцій із ДНК і РНК. В якості векторів для введення ДНК у клітини людини використовують, як правило, вектори на основі генома ретровірусів (25%), а також аденовірусів (28%). 16% всіх

експериментів проведено з використанням незв'язаної або плазмідної ДНК. В 13% випадків використовують катіонні ліпосоми (ліпофекція в 9% випадків), які дозволяють доставляти в клітини людини дуже великі фрагменти ДНК. Ліпосоми в вигляді аерозоля вводять у організм людини через дихальні шляхи, а потім вони потрапляють у клітини шляхом ендоцитозу. Вектори на основі вірусних геномів вводять внутрим'язово або безпосередньо в клітини пухлини. Описані способи трансплантації власних клітин кісткового мозку після їх генетичної модифікації (терапія аутологічними клітинами), а також методи прямого введення ДНК у клітини-мішені.

Приблизно 2/3 всіх розробок в області генної терапії спрямовані на терапію пухлин. Для цього використовують гени, що кодують супресори пухлин (BRCA1 і p53), цитокіни (IL-2), антигени гістосумісності (HLA-B7) або так названі «суїцидні» гени або (достатньо часто – 14%) гени, які кодують антитіла до клітин пухлин. Сучасні методи терапії моногенних захворювань стосуються в основному тяжкого комбінованого імунодефіциту (SCID, human severe combined immunodeficiency), обумовленого дефектом гена аденозиндезамінази.

Таблиця 1. Класифікація генної терапії

За типом клітин-мішеней		За типом векторів		
Фатальна соматична		Біологічні (адено-, ретровіруси)		Фізичні (електропорація, балістика)
За способом введення гена		За типом генотерапії		
<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	Заміна	Посилення експресії	Пригнічення

Таблиця 2. Генотерапія різних захворювань

Моногенне успадкування захворювання	Муковісцидоз Спадкова гіперхолестеренемія Гемофілія В
Онкологічні захворювання	Хронічний гранульоматоз, меланома, рак простати, лейкози
Інфекційні захворювання	СНІД, Епштейна-Бар та цитомегаловірусна інфекції
Судинні захворювання	Склероз коронарних судин, периферичних артерій, атеросклероз нижніх кінцівок
Інші захворювання	Неспецифічний виразковий коліт, боковий амніотрофічний склероз, ревматоїдний артрит, хвороба Альцгеймера

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати технології генної терапії.
2. Надати класифікацію способів генної терапії.
3. Проаналізувати схему трансфекції терапевтичного гена за допомогою вірусного вектора.
4. Визначити принципи генної терапії різних захворювань.
5. Надати характеристику методів ДНК-діагностики.

Тема 2. Клітинні технології – клітинна терапія, тканинна інженерія

Теоретичні відомості

Стовбурові клітини. Стовбурові клітини здатні до необмеженого росту в культурі, та під дією особливих факторів вони диференціюються в спеціалізовані клітини. Стовбурові клітини виявляються не тільки на ранніх стадіях розвитку ембріону, але також у багатьох тканинах дорослої людини. Стовбурові клітини є незамінним об'єктом для фундаментальних досліджень, зокрема для вивчення молекулярних основ диференціювання клітин та мають великі перспективи в медицині (клітинна терапія, тканинна інженерія).

Ембріональні стовбурові клітини. На самому ранньому етапі зародкового розвитку (стадія морули) всі клітини організму, що беруть початок від заплідненої яйцеклітини, є тотіпотентними, тобто мають здатність до диференціювання в різні типи клітин. Якщо на цій стадії морула ділиться навпіл, утворюються однойцеві (монозиготні) близнюки. Через чотири дні після запліднення із морули в результаті багатократного клітинного ділення формується бластоциста, що містить перші диференційовані клітини: поверхневі бластомери стають епітелієподібними клітинами, а клітини внутрішньої порожнини бластули зберігають плюрипотентність. Такий пул ембріональних стовбурових клітин зберігається й на подальших стадіях розвитку ембріону: вони диференціюються в різні типи клітин, наприклад у клітини крові або шкірних покривів. У зародка людини до восьмого тижня після запліднення більшість ембріональних стовбурових клітин вже диференційовано. Таким чином, ембріональні стовбурові клітини можна одержати: 1) із бластоцисти людини, якщо в результаті запліднення *in vitro* утворюється множина бластоцист, із яких необхідна лише одна (або декілька); 2) із ембріональної тканини при абортах; 3) із культури клітин, одержаних в результаті перенесення диплоїдного клітинного ядра в яйцеклітину, власне ядро якої було попередньо видалене, та розвинутих до стадії бластоцисти.

Стовбурові клітини дорослого організму. Мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку лише короткий час знаходяться в кров'яному руслі, а потім вони диференціюються та дають початок всім лініям клітин крові. Стовбурові клітини були виявлені й в інших тканинах дорослих тварин: наприклад стовбурові клітини нейронів. В експериментах з тваринами було показано, що стовбурові клітини можуть зазнавати «передиференціювання», тобто при трансплантації із однієї тканини на іншу набувати нових властивостей, характерних для клітин тканини-реципієнта. Введення стовбурових клітин кісткового мозку пацієнтам, які перенесли інфаркт міокарду, покращає роботу серця. У випадку лейкемії також спостерігається позитивний ефект від терапії стовбуровими клітинами дорослого організму. Дуже велика перевага використання дорослих стовбурових клітин полягає в їх імуносумісності, оскільки донор і реципієнт – одна й та же людина. Вони мають вроджені та набуті протягом життя генетичні дефекти. Крім того, одержання стовбурових клітин дорослого – значно більш складна задача, чим одержання ембріональних стовбурових клітин.

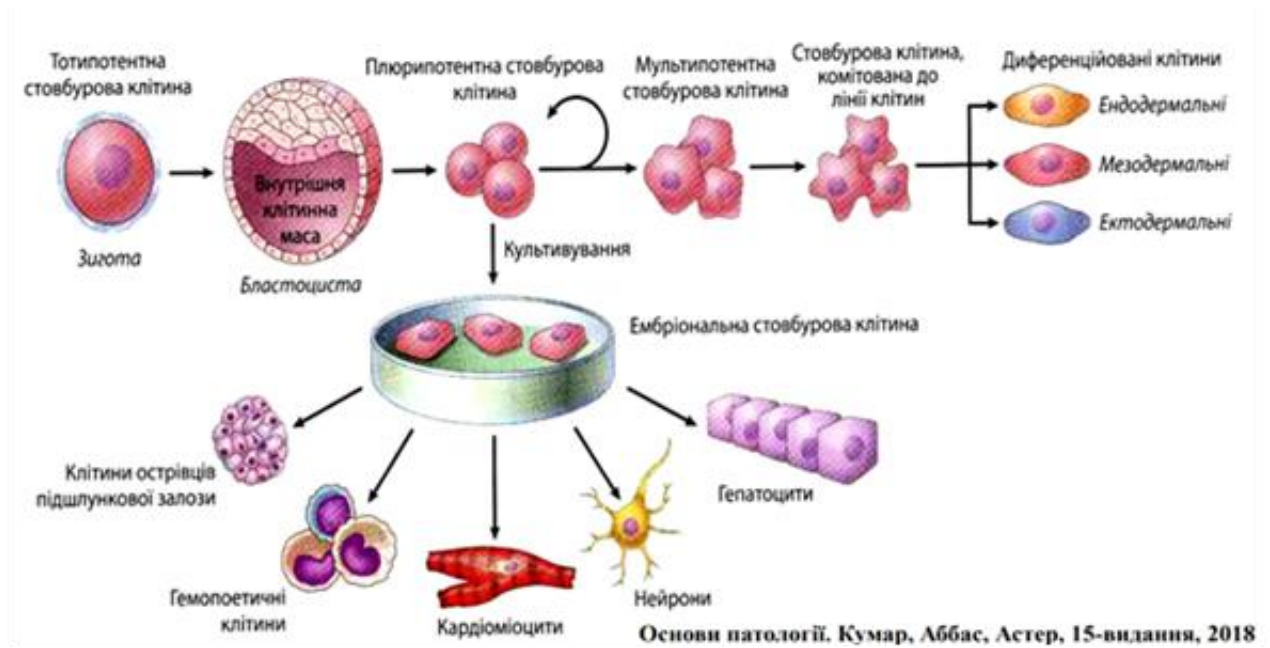


Рис. 1. Схема утворення стовбурових клітин

Ембріональні стовбурові клітини використовуються при вивченні молекулярних механізмів розвитку організму та причин патологій, наприклад вроджених дефектів, онкологічних хвороб тощо. Інший приклад використання ембріональних стовбурових клітин – створення колекції клітинних культур різних ліній з метою вивчення дії нових лікарських препаратів на тканини організму. Третій перспективний напрямок – клітинна терапія хронічних захворювань: зокрема трансплантація клітин островків підшлункової залози, одержаних із стовбурових клітин, змогла б допомогти дітям з діабетом I типу.

Тканинна інженерія. Методи тканинної інженерії дозволяють замінити пошкоджені тканини шляхом трансплантації. Раніше існуюча технологія пересадки тканин при їх пошкодженні (наприклад, при опіках) за останнє десятиріччя була суттєво вдосконалена завдяки появі можливості використання штучно вирощених тканин цілих органів: кісток, хрящів, рогівки ока, м'язів, кровоносних судин, печінки та нервових клітин. Велику роль в цьому досягненні відіграли біосумісні матеріали підкладки та методики роботи зі стовбуровими клітинами.

Регенерація тканин, зв'язаних з матриксом. Позаклітинний матрикс (наприклад, колагенова сітка в кістковій тканині) часто функціонує в організмі як формоутворюючий елемент при рості клітин і визначає будову людського тіла. Штучні матрикси з кераміки, колагенових трубочок, а також плівки, мембрани або мікроскопічні кульки можуть виконувати ту ж саму функцію. Вони можуть бути використані як матеріал підкладки, на якій клітини в присутності відповідних ростових факторів формують штучну тканину (відбувається «експансія»), яка в подальшому може бути перенесена в організм пацієнта.

Тримірні клітинні культури. Багато клітин-попередників і первинні клітини при певних умовах можуть бути культивовані на одному матриксі, в

результаті чого формуються комплексні еквіваленти тканин. Таке вдається, наприклад, при експансії клітин шкірного епітелію в присутності кератоцитів з утворенням штучного епідермісу. Тримірний еквівалент шкіри підтримується завдяки тому, що фібробласти шкіри з кератоцитами розмножуються в матриксі колагену.

Плюрипотентні стовбурові клітини людини – перспективний матеріал для тканинної інженерії завдяки їх здатності диференціюватись у різні клітинні лінії в залежності від відповідного ростового фактору. Кістковий мозок дорослого організму вже давно використовується як джерело стовбурових клітин з мінімальними етичними обмеженнями. Ствобурові клітини також виділяють із пуповини новонароджених. Штучні тканини в теперішній час використовуються переважно для проведення фармацевтичних і косметологічних досліджень. Так, тримірні культури тканин у дослідженнях шкірної переносимості використовують як альтернативу експериментам з тваринами. Шкіру людини використовують також для трансплантації.

Проблеми технології тканинної інженерії. Успіхи регенеративної медицини в більшості випадків залежать від мікрооточення стовбурових клітин. Важливо, щоб стовбурові клітини зберігали здатність до регенерації тканин після їх вилучення з природного середовища, культивування *in vitro* та трансплантації. Наприклад, знаходячись в кістковому мозку, *in vivo*, людські мезенхімальні стовбурові клітини зберігають плюрипотентність, а при культивуванні *in vitro* часто спонтанно диференціюються, що відбувається, мабуть, із-за різкої зміни мікрооточення. Поряд з призначенням ростових факторів, регуляторних біомолекул, суттєве значення має еластичність матриксу в процесі диференціювання МСК. Вплив фізичних властивостей матриксу на морфологічні зміни клітин та спрямованість їх диференціювання опосередковується макромолекулярними актиновими структурами – це приблизно 100 різних білків. Більшість конструктів, одержаних за допомогою інжиніринга тканин, включають тільки один або найбільше два типи клітин, вирощених головним чином у двомірній конфігурації. Тому необхідно оптимізувати виділення, розмноження й диференціювання клітин, сконструювати каркаси або системи доставки, що сприяють підтримці та координації росту тримірних тканин *ex vivo*. Як відомо, будь-яка тканина, поряд зі специфічними клітинами, містить судинні, нервові і фібробласти, є капіляри, нервові закінчення та сполучна тканина. Тому актуальна розробка *ex vivo* технологій одночасного нарощування всіх компонентів тканини шляхом створення підкладки, здатної поступово виділяти фактори росту. Одна із ідеальних стратегій полягає в заборі стовбурових клітин у пацієнта, подальшим розмноженням їх в клітинній культурі та висіві цих клітин на каркаси. Ствобурові клітини можуть дати початок безлічі типів спеціалізованих зрілих клітин в результаті диференціювання, якщо на них впливати конкретними біологічними стимулами, сигнальними молекулами. Це наступний крок на шляху створення «власних» органів для конкретного пацієнта, здатних усунути потребу в донорських органах.

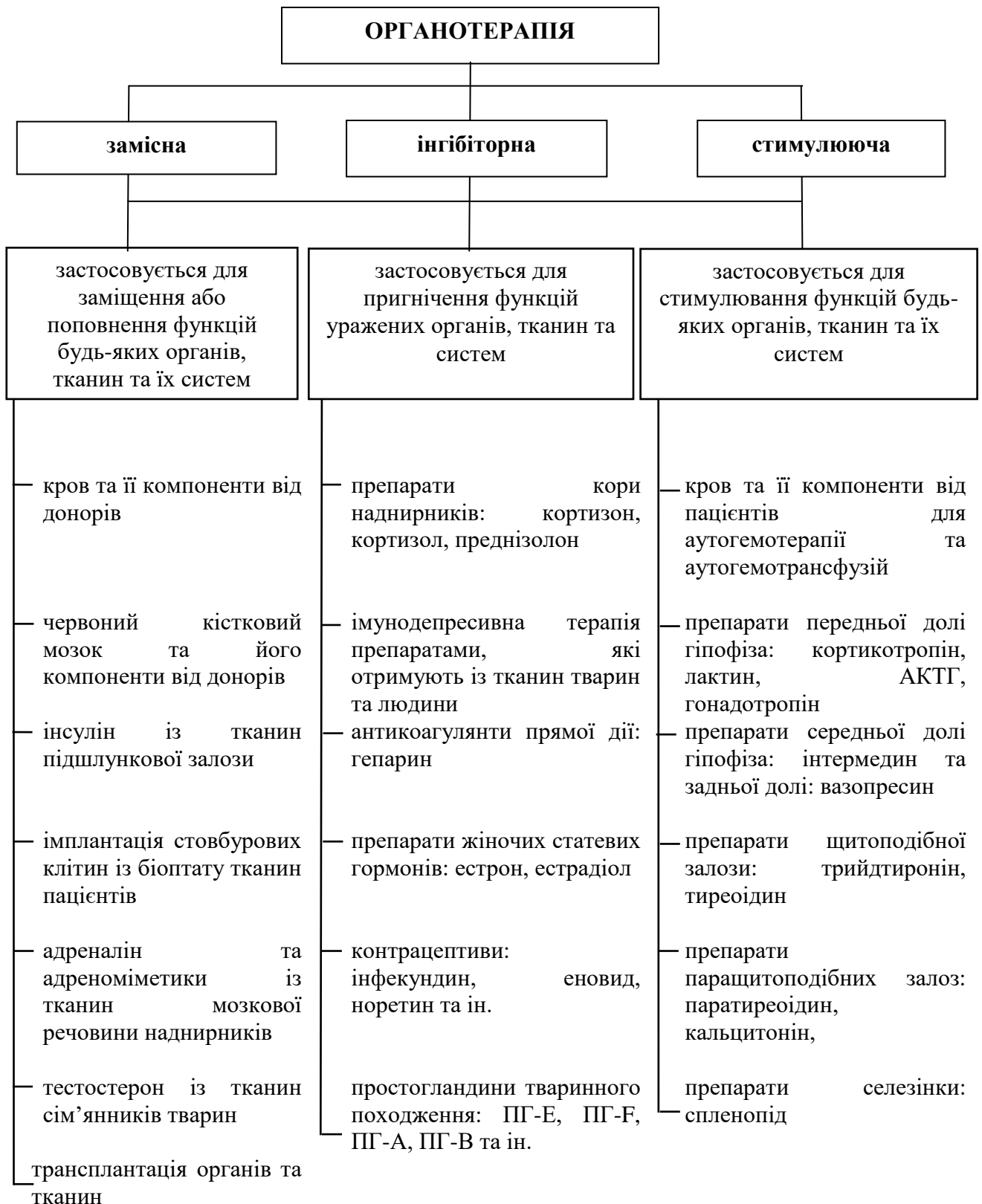


Рис. 2. Класифікація методів органотерапії

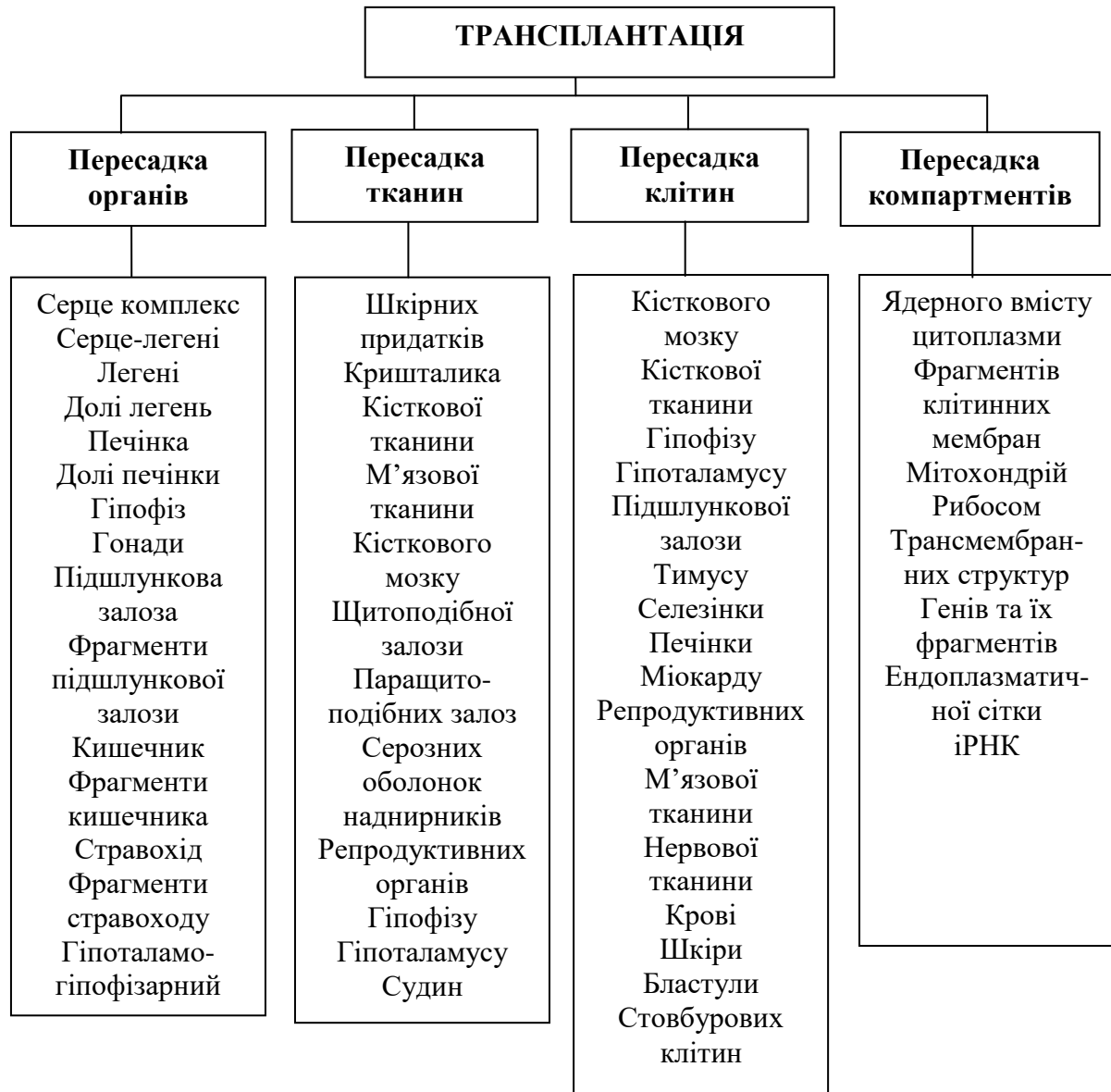


Рис. 3. Класифікація методів трансплантації

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати технології клітинної терапії.
2. Надати схему народження стовбурових клітин.
3. Проаналізувати технології одержання та застосування стовбурових клітин.
4. Визначити принципи тканинної інженерії.
5. Проаналізувати схеми класифікації методів органотерапії та трансплантації.

Тема 3. Біосенсори та біочіпи

Теоретичні відомості

В біосенсорі об'єднані чутливий матеріал біологічного походження (фермент, антитіла, ДНК, мікроорганізми та ін.), що реагує на присутність визначаємого компонента, та фізичний перетворювач сигналу (електрод, оптрод, світлочутливий пристрій, кварцове оптичне волокно та ін.). Найбільше розповсюдження одержали ферментні та мікробні біосенсори.

Електрохімічні біосенсори. На поверхні датчиків у ферментних біосенсорах іммобілізовані ферменти, найчастіше гідролази (для змінення рН середовища) або оксидази (для визначення концентрацій O_2 або H_2O_2). Часто при вимірюванні окисно-відновного потенціалу використовують так названі медіатори. Окисно-відновний потенціал диметилферроцена +100 мВ; це забезпечує високу специфічність сенсора: вдається знизити фонові шуми, так що неспецифічні реакції з іншими компонентами середовища, вірогідно, виключені (редокс-потенціал L-аскорбінової кислоти +170 мВ). Найвідоміший біосенсор – глюкозний електрод. Він використовується при проведенні лабораторних аналізів крові на «цукор» в медичних закладах, при самоконтролі рівня «цукру» крові, а також з метою контролю живильних середовищ у промислових біореакторах. Проводяться розробки вживляємих біосенсорів на глюкозу в комплекті з переносним дозатором інсуліну. Кисневі електроди з іммобілізованими мікроорганізмами використовуються для спостереження за споживанням кисню в культурі. На цьому ж принципі оснований контроль стічних вод після очистки. Застосування біосенсорів дозволяє провести якісну й кількісну оцінку забруднення протягом декількох хвилин, у той час як традиційний аналіз займає приблизно 5 діб. Імунний аналіз може також проводитись за допомогою біосенсорів, в яких учасники електрохімічної реакції містять мітку. ДНК-біосенсори дозволяють виявляти в середовищі речовини, які впливають на генетичний матеріал. Принцип методу заключається в тому, що в результаті взаємодії ДНК з біологічно активними речовинами відбувається зміна фізико-хімічних властивостей нуклеїнової кислоти, що виявляється за допомогою детектора.

Оптичні біосенсори. При взаємодії антитіла з антигеном утворюється білковий комплекс великого розміру з певними оптичними характеристиками, які можна аналізувати, використовуючи оптичне волокно (світлопровід). Оптичні біосенсори знаходять дуже широке застосування завдяки високій чутливості (до 10^{-10} г/л) та можливості одержувати не тільки якісні, але й кількісні дані.

Проточно-інжекційний аналіз. В суворому сенсі слова цей метод не відноситься до біосенсорних (біологічний компонент та перетворювач рознесені в просторі), однак метод знаходить все більше застосування в імуноферментному аналізі та в дослідженнях ДНК. ПІА сполучає в собі аналітичний підхід і автоматизовану обробку рідких проб, тому його часто використовують при безперервному вимірюванні концентрації компонентів

проби. Можливе застосування принципу ПІА в сполученні з мікросистемною технологією, наприклад нанотехнологією.

Рецептори як біосенсиори. Хеморецептори бактерій і органи чуття вищих тварин – приклади природних біосенсорів. На відміну від біосенсорів, створених людиною, рецептори можуть виявляти, а потім швидко кількісно визначати дуже складні комбіновані сигнали (запах троянди, аромат вина та ін.). Розпізнавання подразника в рецепторах основане на порівнянні одержаного сигналу з уже відомими сигналами. Однак навіть найпередовіші технології біосенсорики поки не дозволяють створити прилад, який би наближався до рецепторів за чутливістю та різноманітністю сигналів, що приймаються.

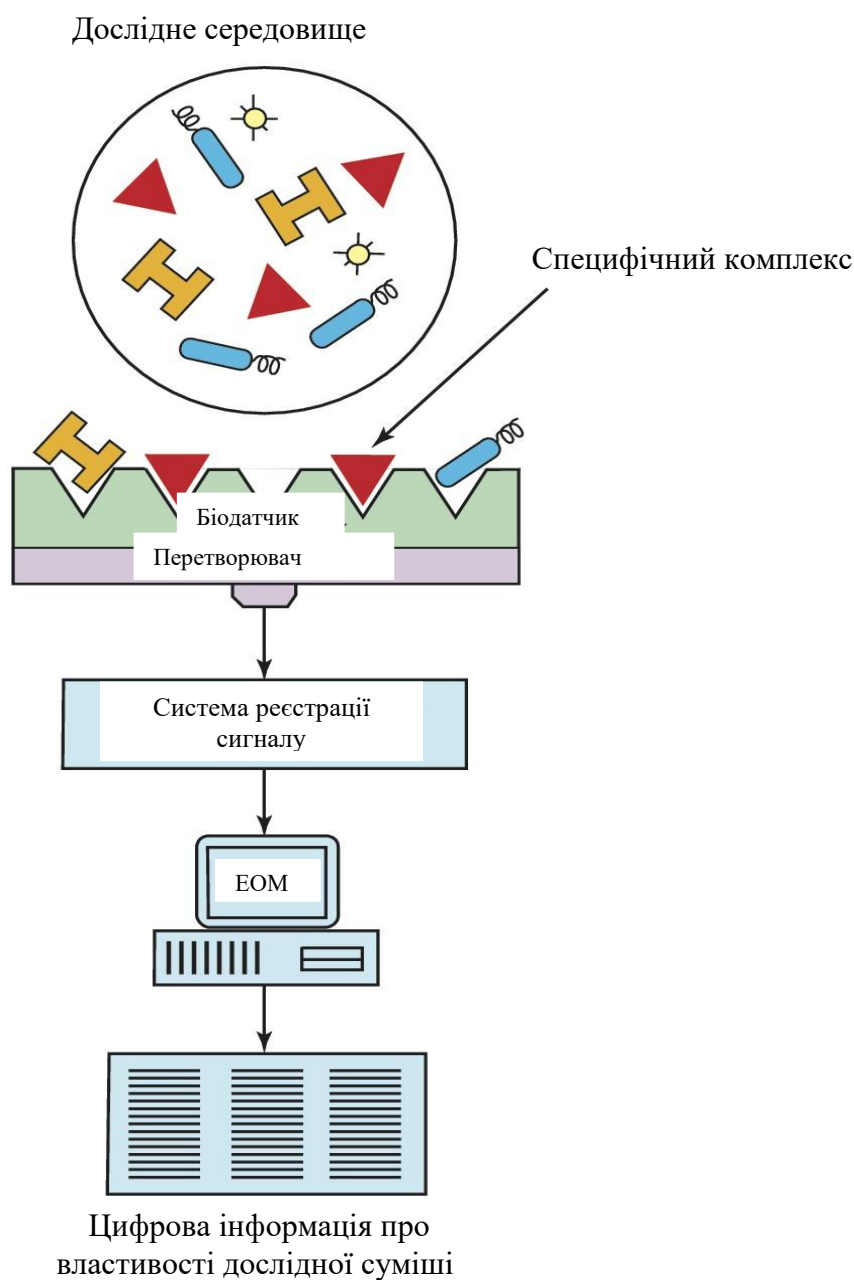


Рис. 4. Принципова схема дії біосенсора

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати технології створення біосенсорів.
2. Проаналізувати схему побудови біосенсора.
3. Визначити принципову схему дії біосенсора.
4. Провести порівняльний аналіз технологій застосування клітинних, гелевих і ДНК-біочіпів.

Тема 4. Наномедицина

Теоретичні відомості

Наномедицина – це застосування наноконструкцій та нанотехнологій у діагностиці, лікуванні та профілактиці захворювань людини.

До найбільш перспективних технологій в області біології відносяться:

- «порівняльної взаємодії» – визначення образу взаємодії різних клітин організму;

- ядерне перепрограмування – можливість клонувати будь-які клітини, використовуючи доступні джерела біологічного матеріалу;

- наномедицина.

Наночастки за структурою можна розподілити на декілька класів:

Біологічні наночастки – це ферменти (білки з каталітичною активністю), молекули ДНК і РНК, рибосоми, клітинні везикули, віруси тощо. Відмітною особливістю таких об'єктів є їх здатність до агрегації та самоорганізації (наприклад, принцип комплементарності, специфічності взаємодії при організації поліпептидного або полінуклеотидного ланцюгів).

Полімерні наночастки – це природні або біоінертні синтетичні полімери: полімолочна й полігліколева кислоти, полілактиди, акрилополімери, поліетиленгліколь (ПЕГ). Полімерні наночастки за морфологією розрізняються на наносфери (суцільні поліметні частки, на поверхні яких розподіляється переносима, активна речовина) і нанокапсули (складаються із полімерної оболонки, що охоплює порожнину з вмісною переносимою активною речовиною).

Дендримери. Дендримери є унікальним класом полімерів з сильно розгалуженою структурою. При цьому їх розмір і форма можуть бути дуже точно задані при хімічному синтезі. Типовими «мономерами», які використовуються в синтезі дендримерів, є поліамідоамін (ПАМАМ) і амінокислота лізин. Активні, переносимі молекули зв'язуються з дендримерами або шляхом утворення комплексів з їх поверхнею, або вбудовуються глибоко між їх окремими ланцюгами. Контролюємі розміри та властивості поверхні, а також стабільність дендримерів роблять їх дуже перспективними для використання в якості переносників.

Неорганічні наночастки – до цього класу звичайно відносять наноструктури, одержані на основі оксиду кремнію, а також різних металів (золото, срібло, платина). Нерідко така наночастка має кремнієве ядро та зовнішню оболонку, сформовану атомами металу. Використання металів дозволяє створювати переносники, що мають ряд унікальних властивостей.

Так, їх активність (проявляється вивільненням лікарської речовини) може бути модульована термічним впливом (інфрачервоне випромінювання), а також зміною магнітного поля. Показано, що металічні наночастки можуть ефективно проникати всередину епідермісу.

Вуглецеві наночастки – нанотрубки й фулерени; вони є одними з самих «впізнаваних» наноструктур. Сьогодні в промислових масштабах фулерени одержують термічним розпиленням вуглецевовмісної сажі в атмосфері інертного газу при зниженому тиску в присутності каталізатора. Нанотрубки мають підвищену спорідненість до ліпідних структур, здатні утворювати стабільні комплекси з пептидами та ДНК-олігонуклеотидами



Рис. 5. Схема застосування нанотехнологій в медицині та біології
Контрольні завдання.

1. Проаналізувати можливості застосування наноконструкцій та нанотехнологій у діагностиці, лікуванні та профілактиці захворювань.
2. Прокласифікувати наночастки за структурою та хімічним складом.
3. Визначити способи адресної доставки лікарських препаратів.
4. Проаналізувати схему застосування нанотехнологій в медицині та біології.

Тема 5. Рекомбінантні білки людини *Теоретичні відомості*

Інсулін – це пептидний гормон, який регулює рівень глюкози в крові. При лікуванні цукрового діабету (*Diabetes mellitus*) інсулін є незамінним. До 1985 р. інсулін одержували із відходів м'ясної промисловості (із підшлункової залози великої рогатої худоби та свиней). Сучасна технологія виробництва

інсуліна основана на використанні рекомбінантних штамів *E. coli* і *Saccharomyces cerevisiae*. Синтез препроінсуліну відбувається в β -клітинах підшлункової залози тварин. Утворений в результаті внутрішньоклітинного процесінгу проінсулін запасується в апараті Гольджі. При недостатчі глюкози в крові проінсулін розщеплюється мембранними протеазами на три поліпептидні ланцюги – А, В і С. Ланцюги А і В (21 та 30 амінокислотних залишки відповідно) зближуються та з'єднуються трьома дисульфідними містками, а центральний С-ланцюг (з 31 амінокислотних залишків) під дією ферментів відщеплюється. Так утворюється активна форма інсуліну.

Гормон росту (соматотропін; ГР; Н або GF), як і інсулін – один з найважливіших гормонів, що одержують методами генетичної інженерії. В організмі людини синтез цього гормону відбувається в передній долі гіпофізу. Гормон росту приймає участь в регуляції багатьох обмінних процесах. В основі його дії лежать два механізми: при повноцінному харчуванні гормон росту інгібує синтез жирів, а невикористана енергія використовується для білкового синтезу, наприклад, в молочних залозах. Цю властивість використовують у тваринництві: додавання гормону росту стимулює лактацію, а також дозволяє одержувати менш жирне м'ясо, збагачене білком. Інший функціональний ефект гормону заключається в стимуляції росту в результаті дії інсуліноподібного фактора росту IGF-1, що синтезується в клітинах печінки. Цей фактор індукує клітинне ділення в більшості тканин організму.

Інші рекомбінантні гормони. В теперішній час клоновані гени багатьох гормонів людини, та досліджується можливість їх застосування в медицині й сільському господарстві. З появою рекомбінантних гормонів відкриваються нові можливості в терапії багатьох захворювань, наприклад застосування паратгормону для лікування остеопорозу. Фолікулостимулюючий гормон людини (ФГС, або FSH) застосовується при діагностиці безпліддя, від якого страждають 50-80 млн. людей.

Інтерферони (IFN) секретуються різними клітинами імунної системи та слугують сигнальними речовинами: імунна відповідь клітини обумовлена зв'язуванням молекул інтерферонів з INF-рецепторами. У ссавців виділяють інтерферони трьох типів: IFN- α , IFN- β і IFN- γ . Ці молекули залучені в регуляцію 20-30 генів і мають широкий спектр імунорегуляторних, противірусних та антипроліферативних (що перешкоджають діленню клітин) властивостей. Молекули IFN- α та IFN- β стабільні при рН 5 і мають спорідненість до одного й того ж рецептору (IFN-рецептор I типу). На відміну від IFN- α і IFN- β молекули IFN- γ нестійкі в кислому середовищі та зв'язуються з рецепторами другого типу (IFN-рецептор II типу).

В теперішній час IFN- α успішно застосовують для лікування гепатитів В і С, а також деяких злоякісних пухлин – раку сечового міхура, меланому, лейкемії та лімфоми. Синтез β -інтерферону (IFN- β) відбувається в фібробластах. IFN- β застосовують при лікуванні розсіяного склерозу. Джерелом γ -інтерферону слугують активовані Т-лімфоцити. В свою чергу IFN- γ активує макрофаги. IFN- γ використовують при лікуванні хронічного

гранульоматозу. В теперішній час проводяться клінічні випробування інтерферонів у терапії злоякісних пухлин (IFN- α , - β и - γ), аутоімунних захворювань (IFN- α и - β), вірусних інфекцій (IFN- α и - β), ревматоїдного артрити та астми (IFN- γ).

Інтерлейкіни (IL) – сигнальні речовини, які виробляються одними клітинами імунної системи та слугують для регуляції активності інших клітин. Тому їх часто називають «гормонами імунної системи». У людини охарактеризовано більше 20 типів інтерлейкінів (IL-1–IL-23). З них IL-2 вже застосовується в медицині, а інші інтерлейкіни знаходяться на стадії дослідження.

Еритропоетин та інші фактори росту. Розвиток техніки роботи з культурами клітин призвело до виявлення великої кількості факторів росту (colony stimulating factors, CSF, колонієстимулюючі фактори), які стимулювали ріст клітин у результаті взаємодії з рецепторами на клітинній поверхні. Ці фактори представляють собою цитокіни – речовини, що синтезуються клітинами в дуже малих кількостях. Методами генетичної інженерії можна одержати їх у необхідних кількостях з метою вивчення властивостей, природи та механізму взаємодії, а також можливостей терапевтичного застосування: особливий інтерес представляє спрямований вплив на ріст певних типів клітин (шкіри, кісток, нервових, еритроцитів та ін.). Так, ЕРО, фактор росту гранулоцитів (G-CSF) і фактор росту гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF) вже успішно застосовуються в медицині. ЕРО стимулює утворення еритроцитів, G-CSF – нейтрофільних гранулоцитів, а GM-CSF – еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів, моноцитів і макрофагів. Ці фактори призначають пацієнтам з анемією, яка часто виникає при проведенні діалізу.

Фактор некрозу пухлин (TNF) був виявлений в результаті спостереження, що при бактеріальній інфекції відбувається уповільнення розвитку деяких пухлин. Під дією бактеріального ендотоксину (ліпополісахариду), в активованих макрофагах, моноцитах, клітинах-кіллерах, а також клітинах мозку й печінки утворюється фактор некрозу пухлин. Існує два варіанти TNF; їх амінокислотні послідовності гомологічні лише на 30%, однак ці глікопротеїни проявляють подібні біологічні властивості.

ДНКаза I (Pulmozyme®). Муковісцидоз – спадкове захворювання, в більшості випадків з летальним кінцем, пов'язане з накопиченням у легенях слизу, що утруднює дихання. Підвищена в'язкість слизу обумовлена присутністю позаклітинної ДНК із лейкоцитів, що розпадаються. Для лікування (інгаляції) використовується рекомбінантна ДНКаза I людини (260 амінокислотних залишків), яка синтезується в клітинах СНО.

Глюкоцереброзидаза. Хвороба Гоше – спадкове захворювання, причиною якого є накопичення глюкоцереброзидів у деяких клітинах в результаті зниженого вмісту глюкоцереброзидази (Cerezyme™). В залежності від клінічних симптомів розрізняють три варіанти протікання хвороби. Найбільш тяжка форма I характеризується болями в кістках та відділах травного тракту.

Ці симптоми можуть бути згладжені при регулярному внутрішньовенному введенні глюкоцереброзидази. Глюкоцереброзидазу людини одержують із плаценти або в вигляді рекомбінантного продукту, що утворюється в клітинах СНО.

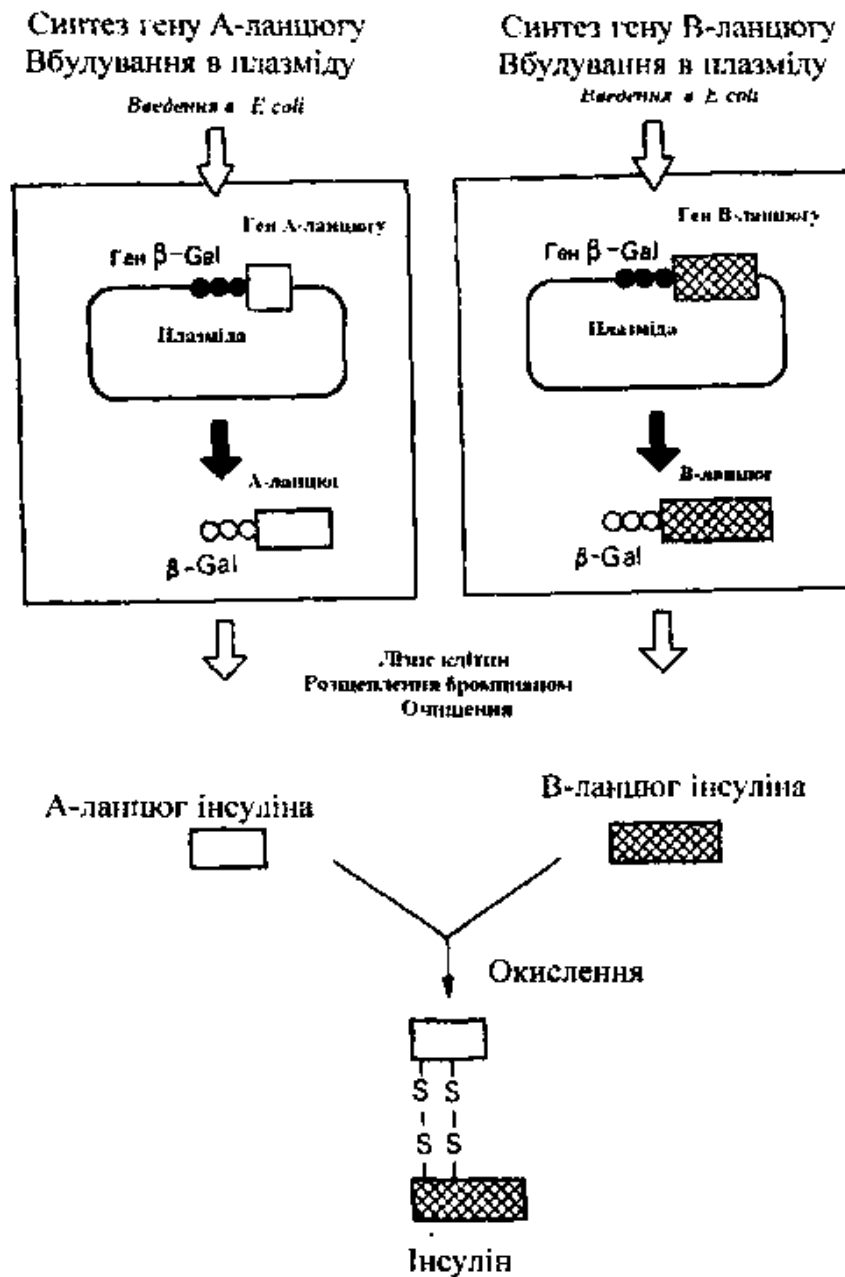


Рис. 6. Схема синтезу генно-інженерного інсуліну

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати технології одержання інсуліну, людського гормону росту, інтерлейкінів, інтерферону, еритропоетину.

2. Визначити принципи виробництва рекомбінантних білків, експресованих в рослинах.

3. Визначити принципи виробництва рекомбінантних білків, експресованих в клітинах ссавців.

4. Проаналізувати схему синтезу генно-інженерного інсуліну.

Тема 6. Моноклональні антитіла в терапії та діагностиці

Теоретичні відомості

Моноклональні антитіла. На відміну від поліклональних антитіл, які представляють собою суміш різних антитіл, які продукуються В-лімфоцитами у відповідь на введення тварині, препарати моноклональних антитіл гомогенні. Для їх одержання використовують гібридомну технологію, тобто створюють «безсмертну» лінію клітин, що продукують антитіла певної специфічності.

Технологія гібридом. Тварин (звичайно мишей) імунізують антигеном. Коли в організмі тварини кількість антитіл сягає високого рівня, із селезінки виділяють лімфоцити. Потім здійснюють злиття цих клітин з клітинами мієломної лінії, які мають здатність до необмеженого росту. Частина отриманих злитих клітин здатні продукувати антитіла, як вихідні лімфоцити, та мають здатність до необмеженого росту, як клітини мієломи. Такі клітини вдається виділити із суміші спеціальними імунологічними методами селекції. Підходящі клони заморожують при низькій температурі, та вони зберігають здатність до утворення антитіл протягом багатьох років.

Виділення моноклональних антитіл. Клітини гібридами мають здатність до необмеженого росту. Їх вирощують в культурі, а потім із культуральної рідини виділяють моноклональні антитіла (до 30 мг/л). До складу середовища росту, крім глюкози й глутаміну, входить сироватка зародка теляти, багата на важливіші цитокіни та інші речовини, що необхідні для росту (наприклад, лактоферин). Клітини гібридами звичайно ростуть у аеробних умовах на поверхні середовища, однак їх можна вирощувати й в суспензії. В лабораторних умовах клітини гібридами вирощують у повільно обертаючих ємностях. Для одержання антитіл у промислових масштабах використовують біореактори об'ємом до 10 м³, в яких клітини гібридом культивують на особливих живильних середовищах з підтриманням постійного рівня O₂ і CO₂. У теперішній час для промислового одержання антитіл, як правило, використовують суспензії вільних клітин гібридом. Процес ферментації здійснюють в періодичному або в неперервному режимі. Для концентрування культуральної рідини часто використовують ультрафільтрацію, після якої проводять первинну очистку антитіл методом афінної хроматографії з білком А, а потім – тонку очистку, що включає іонообмінну та гель-хроматографію для видалення сторонніх білків і агрегатів антитіл.

Людські антитіла. Медичне застосування мишиних моноклональних антитіл для лікування або діагностики захворювань людини в системі *in vivo* тягне за собою ризик виникнення імунної реакції, так як антиген-зв'язуючі ділянки антитіл мишей і людини можуть значно відрізнятись одна від одної. Імунізація людини в експериментальних цілях неможлива по етичним причинам, у той час як культивування клітин мієломи людини є надто складною технічною задачею. З цих причин були розроблені інші методи одержання антитіл: 1) в клітинних культурах лімфоцитів людини при додаванні в середовище росту антигену та специфічних факторів (таких як

гормони росту й цитокіни) – імунізація *in vitro*; 2) із селезінки імунодефіцитних мишей, яким введені лімфоцити людини; 3) одержання рекомбінантних мишиних антитіл, що несуть антиген-зв'язуючі ділянки антитіл людини.

Рекомбінантні та каталітичні антитіла. Методи генетичної інженерії дозволяють експресувати нативний або модифікований ген антитіла в різних клітинах-хазяїна. В теперішній час у мікроорганізмах одержують тільки фрагменти антитіл, поперед все одноланцюгові (single-chain) антитіла або Fab-фрагменти. Цілі молекули антитіл – імуноглобулін IgG – вдається експресувати в бакуловірусах, культурах еукаріотичних клітин, у молоці трансгенних тварин, а також у трансгенних рослинах (plantibodies). Рекомбінантні антитіла могли б знайти широке застосування в медичній діагностиці. Біспецифічні та біфункціональні антитіла, зв'язуючись з певним антигеном, можуть слугувати для доставки лікарських речовин у клітинні мішені або для імуносупресії. За допомогою антитіл, одержаних комбінаторними методами, вдається ідентифікувати велику кількість білків, виявлених на гелях після проведення двомірного електрофорезу або в мікросліпах. Каталітичні антитіла є перспективними для біотрансформації.

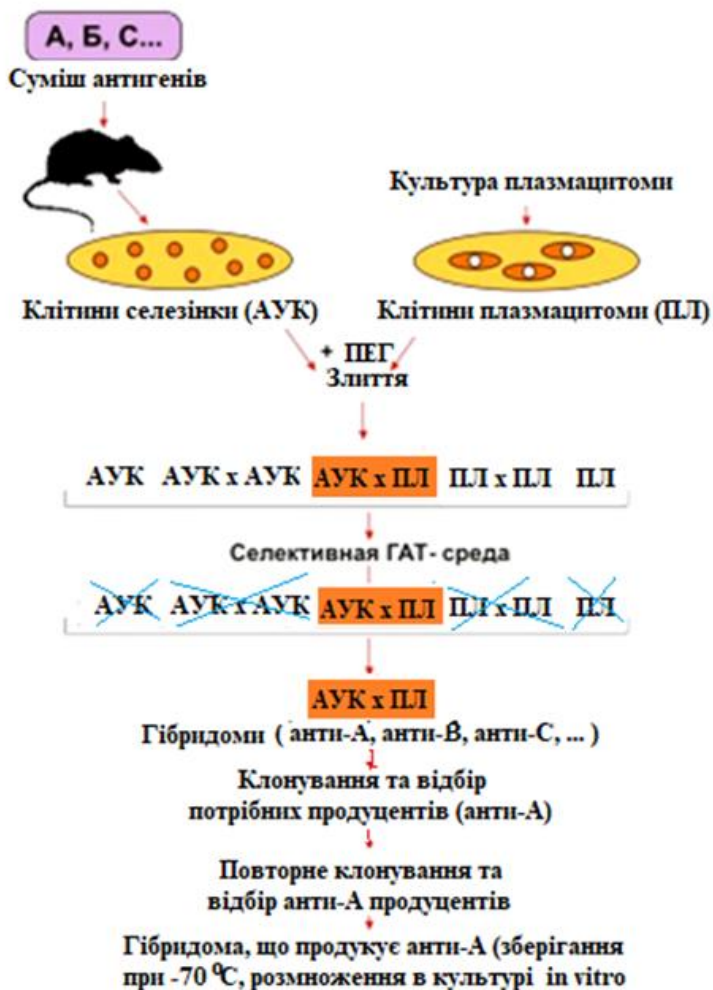


Рис. 7. Технологія отримання гібридом

Контрольні завдання.

1. Визначити типи моноклональних антитіл.
2. Провести порівняльний аналіз гібридомної технології, технології рекомбінантної ДНК і технології отримання одноланцюгових антитіл.
3. Охарактеризувати методи діагностики захворювань із використанням моноклональних антитіл.
4. Визначити механізми дії терапевтичних моноклональних антитіл.

Тема 7. Біотехнологія ферментів

Теоретичні відомості

Ферменти в клінічних аналізах. При клінічній діагностиці важливу роль відіграють лабораторні аналізи, де широко застосовуються ферменти різних класів. При цьому використовується властивість фермента специфічно каталізувати реакцію, в якій приймає участь лише один компонент складного середовища. Щоб одержати правильний результат аналізу, в ферментному препараті повинні бути відсутніми інші активності; тому до ступеню очистки ферментів, що застосовуються при проведенні клінічних аналізів, пред'являються дуже суворі вимоги. Аналізи великої кількості проб проводять за допомогою лабораторних автоматичних аналізаторів, тест-смужок або біосенсорів. Ферменти також застосовуються в якості репортерних сполук (маркерів) в реакціях специфічного зв'язування антитіл або нуклеїнових кислот (імунний або ДНК-аналіз): в присутності надлишку субстрата ферменти значно збільшують інтенсивність сигналу.

Методи детектування. В ферментативному аналізі частіше за все використовуються флюорометричні або люмінесцентні методи реєстрації продукту реакції. Якщо продукт реакції неможна визначити безпосередньо, використовують додаткові ферменти, так названу сопряжену систему ферментативних реакцій, продукти яких можна зареєструвати. Сучасні спектрофотометри дозволяють проводити виміри в дуже малих об'ємах зразка (декілька мікролітрів).

Ферментативні методи визначення концентрації. Ферментативні методи розподіляються на: а) метод кінцевої точки титрування; б) кінетичний метод; в) метод ферментативного каталізу. Кінцева точка титрування дає можливість визначення кількості субстрату або ко-субстрату, який повністю перетворився на продукт. Так, за допомогою алкогольдегідрогеназної реакції визначають вміст спирту, а за допомогою лактатдегідрогеназної – лактату. Такий аналіз виконується всього за декілька хвилин. Прикладом визначення концентрації субстрату за продуктом сопряженої реакції є ферментативне визначення глюкози за допомогою гексогінази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Інший, значно більш швидкий метод визначення глюкози – кінетичний. При цьому аналізують не кінцеві продукти реакції, а вимірюють початкову швидкість реакції (метод початкових швидкостей). Коли концентрація субстрату значно нижче K_m (менше 1/10), швидкість реакції лінійно залежить від концентрації субстрату. Цей метод лежить в основі дії автоматичних аналізаторів.

Каталітичний метод аналізу оснований на тому, що кількість аналізованої речовини є лімітуючим фактором у циклічному каталітичному процесі, в якому вона розкладається в ході одної ферментативної реакції та утворюється в ході іншої. Кількість аналізованої речовини визначають за зміною кількості одного із учасників циклічного процесу.

Отримання та властивості. Об'єми виробництва ферментів, що використовуються в медицині при проведенні лабораторних аналізів, невеликі, однак ці препарати ферментів повинні мати дуже високу чистоту. Звичайно це внутрішньоклітинні білки, які утворюються в клітині в малих кількостях, тому для їх виділення та очистки використовують спеціальні методи. До теперішнього часу одержано багато рекомбінантних штамів суперпродуцентів. Методами генетичної інженерії в ген фермента можуть бути внесені зміни, й такий білок буде мати властивості оптимальні для свого виділення та застосування. Поряд з чистотою й високою специфічністю фермент повинен залишатись активним протягом достатньо тривалого часу, тому в препарат додають різні стабілізатори, завдяки чому при зберіганні при температурі до +40°C ферменти втрачають менше 20% активності на рік.

Таблиця 3. Застосування ферментів в медицині

Призначення	Ферменти	Приклади використання
Діагностика	Лактатдегідрогеназа (ізофермент ЛДГ1)	Інфаркт міокарда
	Аспартатамінотрансфераза (АСТ)	Інфаркт міокарда
	Аланінамінотрансфераза (АЛТ)	Інфекційний гепатит, інфаркт міокарда
	Креатинфосфокіназа (КФК)	Прогресуюча дистрофія, інфаркт
	Кисла фосфатаза	Рак передміхурової залози
	α-Амілаза	Захворювання підшлункової залози
Лікування	Пепсин	Порушення травлення у шлунку
	Трипсин, хімотрипсин	Порушення травлення
	Стрептокіназа, урокіназа	Попередження тромбоутворення
	Гіалуронідаза	Руйнування рубців
	Аспарагіназа	Лікування деяких злоякісних захворювань
	Нуклеаза	Вірусний кон'юнктивіт, риніт, бронхіт
	Уреаза	Видалення сечовини з організму в апараті «штучна нирка»
В ролі аналітичних реактивів	Глюкозооксидаза	Визначення концентрації глюкози
	Холестеролоксидаза	Визначення холестерину в крові
	Ліпаза	Визначення триацилгліцеринів в крові
	Уреаза	Визначення сечовини в крові

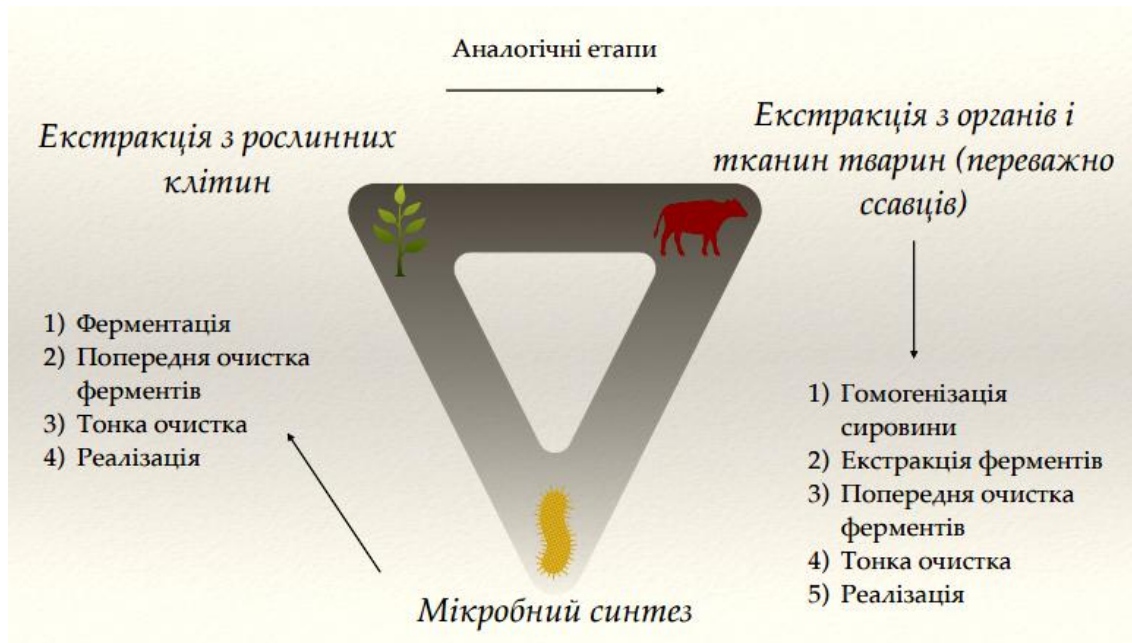


Рис. 8. Схема технологій отримання ферментів
Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати технології мікробного синтезу ферментів.
2. Охарактеризувати технології виділення ферментів із органів і тканин ссавців.
3. Проаналізувати методи отримання рекомбінантних ферментів.
4. Визначити перспективні напрямки ензимодіагностики та ензимотерапії.

Тема 8. Технології виробництва антибіотиків *Теоретичні відомості*

Антимікробна дія антибіотиків обумовлена пригніченням функцій мікроорганізмів: 1) біосинтез і функціонування генів; 2) біосинтез клітинних компонентів; 3) біосинтез і функціонування білків; 4) біосинтез і функціонування клітинної мембрани; 5) біосинтез клітинної стінки. Як правило, дія антибіотика є результатом складного ланцюгу його взаємодії з клітинними компонентами. У мікроорганізмів існує генетично запрограмований механізм пристосування до умов середовища, що змінюються, тому створення нових антибіотиків і поява нових резистентних штамів мікроорганізмів відбуваються в один і той же час.

Скринінг бактеріальних штамів з метою виявлення антимікробної активності здійснюють за їх впливом на поведінку контрольного штаму. Після того як на штамі виявлена антимікробна активність, антибіотик виділяють, очищують і аналізують його структуру. Як правило, у нового антибіотика будова молекули подібна до будови молекул вже вивчених речовин. Щоб збільшити ефективність пошуку штамів продуцентів антибіотиків, розробляють нові методи скринінгу, наприклад з використанням біохімічних або біологічних чіпів, застосовують нові хіміко-аналітичні методи, а також

шукають можливі мішені для дії антибіотиків (в бібліотеках синтезованих сполук шукають речовини, які діють на певну функцію мікроорганізмів).

Вдосконалення штамів. Антибіотики є продуктами вторинного метаболізму в мікроорганізмів і виділяються в середовище росту в дуже невеликих кількостях (декілька міліграмів на літр культуральної рідини). Тому, якщо виявлений антибіотик представляє інтерес, то перед дослідником стає задача підвищити рівень його синтезу. Удосконалення штаму полягає в багатократному повторенні актів мутагенезу з подальшою селекцією й зворотним «схрещуванням». Таким чином вдається підвищити вихід антибіотика в 10^3 - 10^6 разів у порівнянні з диким штамом. Методи генетичної інженерії, наприклад введення додаткових копій генів ферментів, що відіграють ключову роль у синтезі антибіотиків, також дозволяють одержати нові штамми-суперпродуценти.

Ферментація та переробка. У більшості антибіотиків досить складна структурна формула, часто з декількома стереоцентрами, тому хімічний синтез зрідка використовується для їх виробництва. Промислове отримання антибіотиків здійснюється ферментацією в біореакторах. Живильне середовище містить такі некоштовні джерела вуглецю й азоту, як меласа, лактоза й соєве борошно. По мірі уповільнення росту із-за вичерпання живильних речовин клітинна культура переходить у ідіофазу, саме тоді синтезуються антибіотики. Більшість штамів-продуцентів антибіотиків стійкі до своїх катаболітів тільки в цьому стані, тому для запобігання самознищення система повинна швидко досягти ідіофази, а потім культивувати мікроорганізми в цій фазі. Якщо в якості продуцента антибіотиків використовують гриби або актиноміцети, поряд з оптимізацією складу живильного середовища особливу увагу приділяють концентрації кисню, так як клітини міцелію досить чутливі до аерації. Утворення антибіотиків – продуктів вторинного обміну речовин – починається після того, як клітини досягли стаціонарної фази росту. Як правило, антибіотики є позаклітинними продуктами аеробного обміну речовин і погано розчиняються в воді. По закінченні циклу ферментації клітини видаляють центрифугуванням, із середовища екстрагують розчинні в ньому живильні речовини, а потім продукт очищують перекристалізацією або хроматографічно. Промислові процеси отримання, очистки й підготовки антибіотиків, які використовуються в медичних цілях, проводяться під суворим контролем у повній відповідності до сертифікованих правил організації виробництва й контролю якості лікарських засобів (Good Manufacturing Practice, ISO 9000).

Резистентність до антибіотиків. Мікроорганізми, що проявляють стійкість до антибіотиків, дуже розповсюджені та це становить головну проблему для медицини. Неухильно зростає число штамів стафілококів, стрептококів, ешерихій, сальмонел, мікобактерій та ін., стійких до цілого ряду антибіотиків. Найважливіші механізми, що забезпечують стійкість мікроорганізмів до дії антибіотиків: а) порушення процесу надходження антибіотика в клітину або прискорене виділення його із клітини (наприклад, в результаті зміни

проникності мембрани); б) специфічні зміни структур, що є мішенню дії антибіотика; в) генетично запрограмовані ферментативні реакції, які забезпечують стійкість до антибіотика. Деякі генетичні дефекти можуть розповсюджуватись серед різних видів мікроорганізмів за допомогою плазмід, фагів або транспозонів. Таким чином, після виявлення нового антибіотика потрібно продовжити дослідження, щоб знайти його аналоги на основі існуючих антибіотиків, що застосовуються, наприклад, в сільському господарстві для покращання росту й профілактики захворювання худоби. Такі аналоги знадобляться для боротьби з патогенами, стійкими до дії існуючих антибіотиків.

Нові стратегії скринінгу. Використання класичного методу скринінгу, зокрема з застосуванням біочіпів, призводить до того, що із 10 проаналізованих речовин 9 мають нову, раніше невідому структуру, але зовсім не обов'язково нові властивості. Таким чином, очевидна необхідність розробки нових підходів до пошуку речовин, що проявляють антибіотичну дію. Приклади принципово нових стратегій:

а) «Біосинтез, спрямований попередником» – напівсинтетичний метод, при якому в середовище росту мікроорганізма-продуцента додають речовини-попередника антибіотика;

б) скринінг серед маловивчених мікроорганізмів, наприклад міксобактерій, рідкісних актиноміцетів, лишайників або губок;

в) удосконалення технології мікрочіпів;

г) пошук проміжних продуктів метаболізму;

д) здійснення генетичної рекомбінації між різними продуцентами антибіотиків;

е) пошук попередників антибіотиків методами «зворотної генетики»;

ж) здійснення рекомбінації генів – учасників біосинтезу антибіотиків в системі *in vitro*, й використання отриманих ферментів у синтезі нових речовин *in vivo* (комбінаторний біосинтез);

з) пошук нових мішеней дії антибіотиків на основі аналізу генома патогенних мікроорганізмів.

Зворотна генетика. Якщо в певному організмі встановлена нуклеотидна послідовність гена фермента, що приймає участь в біосинтезі антибіотика, ця інформація може послужити для пошуку генів, кодуєть ту ж ферментативну активність в геномній ДНК інших організмів. Так була отримана важлива інформація про взаєморозташування генів, відповідальних за синтез макролідних антибіотиків.

Комбінаторний біосинтез. Прикладом може слугувати отримання нових макролідних антибіотиків зі зміненими властивостями. Гени, кодуєть три ферменти комплексу полікетидсинтази, каталізуючої нарощування вуглецевого ланцюгу, організовані в вигляді кластера. Аналогічним образом розташовані й гени ферментів, які визначають модифікації полікетидного ланцюгу. Клонування всіх цих генів дозволило здійснити обмін генами між кластерами, і рекомбінантні ДНК у складі плазмід знову були внесені в

клітини організму-хазяїна. Так було отримано декілька нових макролідних антибіотиків, не знайдених в природі та володіючих специфічними властивостями.

Пошук нових мішеней для дії антибіотиків методами геномного аналізу. З кожним роком збільшується число мікроорганізмів, для яких нуклеотидна послідовність генома повністю відома. Мікроорганізми – збудники інфекцій людини, геном яких у теперішній час секвенований: *Haemophilus influenzae* (1,83 млн п.н., хронічний бронхіт), *Helicobacter pylori* (1,67 млн п.н., виразкова хвороба), *Borellia burgdorferi* (0,91 млн п.н., бореліоз), *Mycobacterium tuberculosis* (4,41 млн п.н., туберкульоз), *Treponema pallidum* (1,14 млн п.н., сифіліс), *Chlamydia trachomatis* (1,04 млн п.н., трахома та ін.). Аналіз геному дозволяє виявляти особливості метаболізму або сигнальні шляхи, специфічні для патогенного організму. Згодом ця інформація може слугувати для створення антибіотиків, які діють на нові «мішені». Так, в теперішній час проводяться роботи по створенню антибіотика, який діє проти *Helicobacter pylori*; за даними геномного аналізу ймовірною мішенню дії цього нового антибіотика можуть бути ферменти – учасники обміну нікелю в мікроорганізмі.

Таблиця.4 Продуценти, природа та спектр дії антибіотиків

Антибіотик	Мікроорганізм	Спектр дії
1	2	3
Пеніцилін	<i>Penicillium notatum</i>	Грам+ бактерії, спірохети
Цефалоспорин	<i>Cephalosporum</i> sp	Грам+ та грам- бактерії
Грізеофульфін	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Гриби
Стрептоміцин	<i>Streptomyces griseus</i>	Грам+, грам- бактерії, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Неоміцин	<i>Streptomyces fradiae</i>	Грам+ та грам- бактерії
Мономіцин	<i>Streptomyces carculatus</i> var. <i>monomycini</i>	Грам+ та грам- бактерії, найпростіші, гриби
Канаміцин	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Грам+, грам- бактерії, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Гентаміцин	<i>Micromonospora purpurea</i>	Грам+, грам- бактерії
Ристоміцин	<i>Proactinomyces fructiferi</i> var. <i>nistomycini</i>	Грам+ бактерії
Лінкоміцин	<i>Streptomyces lincolnensis</i> var. <i>lincolnensis</i>	Грам+ бактерії
Віоміцин	<i>Streptomyces fradiae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Рифаміцин	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Грам+, грам- бактерії, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Циклосерин	<i>Streptomyces orchidaceus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
1	2	3
Тетрациклін	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Грам+, грам- бактерії, рикетсії

Еритроміцин	<i>Streptomyces erythreus</i>	Грам+ бактерії
Олеандоміцин	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Грам+ бактерії
Новобіоцин	<i>Streptomyces spheroides</i>	Грам+ бактерії
Ністатин	<i>Streptomyces noursei</i>	Гриби
Леворин	<i>Streptomyces levoris</i>	Гриби
Гігроміцин В	<i>Streptomyces hydroscopicus</i>	Грам+ бактерії, гельмінти
Актиноміцин	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Грам+ бактерії, пухлинні клітини
Оливоміцин	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Грам+ бактерії, пухлинні клітини
Брунеоміцин	<i>Streptomyces albus</i> var. <i>bruneomycini</i>	Грам+ бактерії, пухлинні клітини
Рубоміцин С	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	Грам+ бактерії, пухлинні клітини
Мітоміцин С	<i>Streptomyces caespitosus</i>	Грам+ бактерії, пухлинні клітини
Тиротрицин	<i>Bacillus brevis</i>	Грам+ бактерії
Граміцидин С	<i>Bacillus brevis</i>	Грам+, грам- бактерії
Бацитрацин	<i>Bacillus subtilis</i>	Грам+, грам- бактерії
Поліміксин	<i>Bacillus polymyxa</i>	Грам+, грам- бактерії
Нізін	<i>Streptococcus lactis</i>	Грам+, грам- бактерії, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

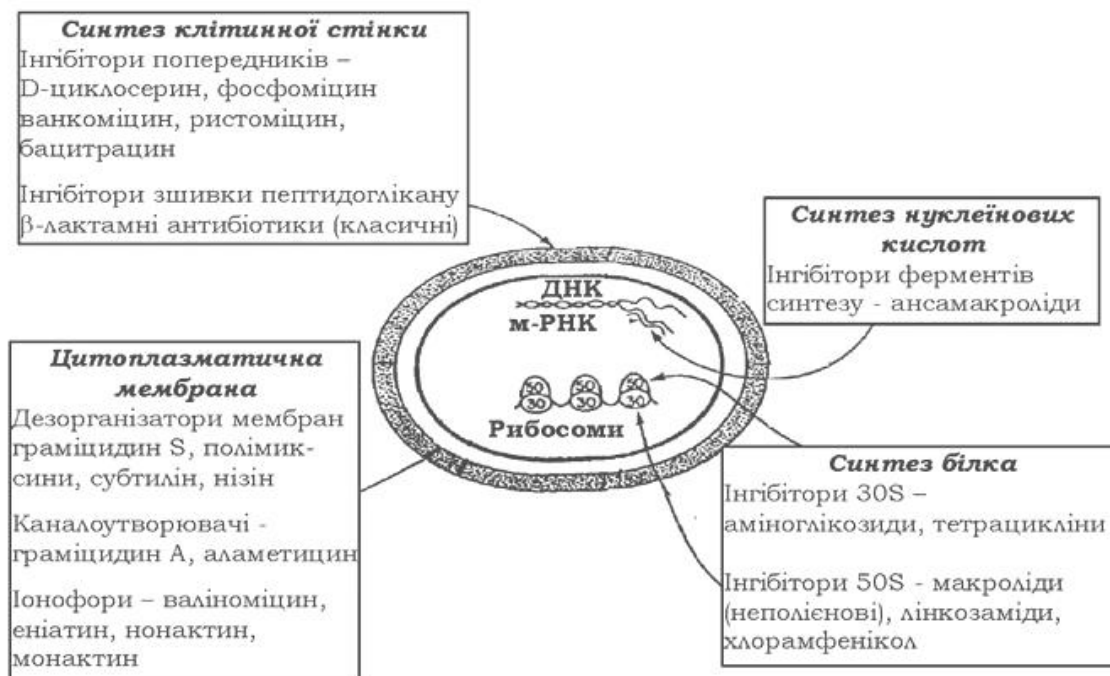


Рис. 9. Мішені дії антибіотиків
Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати продуцентів, природу та спектр дії антибіотиків.

2. Визначити метаболічні шляхи біосинтезу антибіотиків мікроорганізмами.
3. Визначити механізми антибактеріальної дії антибіотиків.
4. Охарактеризувати стадії мікробіологічного синтезу антибіотиків.
5. Проаналізувати технології отримання нових антибіотиків.

Тема 9. Пробіотики

Теоретичні відомості

Пробіотики – це біопрепарати, що містять живі мікроорганізми – симбіонти людини, які мають здатність відновлювати порушену мікроекологію організму. При прийомі всередину вони колонізують слизову оболонку відповідних відділів кишечника, продукують БАР – органічні кислоти, бактеріоцини й інші метаболіти, що пригнічують ріст і розмноження патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Пробіотики також сприятливо впливають на фізіологічний стан кишечника, здійснюють детоксикуючу та імуномодельючу дії. У здорової людини мікробіота, що колонізує кишечний, генітальний біотопи в своїй більшості представлена симбіонтними мікроорганізмами – це стан еубіозу. При самих різних захворюваннях й особливо при патології тих органів, де вегетує симбіонтна мікробіота, порушується мікроекологія в біотопах, починають домінувати випадкові або транзиторні, в тому числі умовно-патогенні мікроорганізми, а кількість симбіонтів зменшується – це стан дисбактеріозу. Дисбактеріоз в свою чергу обтяжує або є причиною інших захворювань. Щоб відновити еубіоз, порушену мікроекологію, потрібно відновити в першу чергу популяційний рівень симбіонтної мікробіоти, одночасно й мікрофункціональний стан слизової оболонки, де вона вегетує. Пробіотики розроблені й застосовуються, поперед все, з метою корекції мікроекології. До симбіотичних мікроорганізмів, що використовуються в якості пробіотичних препаратів, відносяться біфідобактерії, лактобацили, стрептококи, інші представники нормальної мікробіоти – це *Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*, *B.breve*, *B.adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb.lactis*, *Lb.plantarum*, *Lb.fermentum*, *Lb. casei*, *Lb.ramnosus*, *Streptococcus lactis*, *Str.cremoris*, *Bacillus subtilis* та ін. Вони характеризуються стійкістю в кислому середовищі, до жовчних солей, активно колонізують кишковий та інші біотопи слизової відкритих порожнин організму. В ветеринарній практиці при розробці пробіотиків, поряд з вищезазначеними мікроорганізмами використовуються *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pintolonesi*, *Aspergillus niger*, *Asp.oryzae*.

Пробіотичні препарати розробляють на основі одного або декількох штамів одного виду, консорціума із різних видів, а також використовують композиції, що поєднують мікроорганізми-симбіонти з сорбентом, ферментом, імуномодулятором і ін.

Рекомбінантні пробіотичні препарати отримують на основі модифікованих мікроорганізмів, що містять гени, індукуючі продукцію

цитокіну ІЛ-10 та іншого регуляторного протеїну TFF-фактора (*Lactococcus lactis*), які продукують альфа-інтерферон людини (*B.subtilis*) і ін.

Найчастіше пробіотики розробляються на основі біфідобактерій і лактобацил. Розроблена й опанована технологія мікрокапсулювання пробіотиків. Це заключення в тонку оболонку із полімерних речовин природного походження. Оболонка дозволяє захистити бактерії від впливу шлункового соку й інших факторів середовища, максимально локалізувати їх дію в кишковому біотопі. Антагоністичні властивості пробіотичних мікроорганізмів, що присутні в свіжовиготовленій рідкій формі більш виражені, чим у тих же штамів, які знаходяться в ліофілізованому стані; це може бути пов'язано з присутністю в рідких формах пробіотиків більш високих концентрацій оцтової, молочної кислот, перексиду водню, а можливо й інших антагоністичних і інших регуляторних субстанцій-метаболітів. Рідкі пробіотики в якості БАДів виробляються у відповідності з нормами для харчових біопрепаратів.

В перспективі можлива заміна живих мікроорганізмів у складі препарату на їх окремі компоненти й продукти обміну (наприклад, коротколанцюгові жирні кислоти, пептидоглікани клітинної стінки, ДНК). Також можливо створення в майбутньому криобанків мікробіоценозів здорових людей, які можуть бути в подальшому використані для аутоімплантації, для спрямованого конструювання аутопробіотиків.

Пребіотики – це сполуки різного немікробного походження, здатні стимулювати симбіотну мікробіоту кишечника. Вони забезпечують функціональне харчування облигатних бактерій кишечника, є джерелом енергії для них, знижують потенціал росту умовно-патогенної кишкової мікробіоти, посилюють енергозабезпечення й регенерацію епітелія товстої кишки, активують імунітет, не підлягають гідролізу травними ферментами людини, не абсорбуються в верхніх відділах травного тракту й позбавлені побічних ефектів при тривалому застосуванні. Це лактулоза, пантотенова кислота, інουλін та ін.

Таблиця 5. Різні групи пробіотиків

Групи препаратів	Монокомпонентні	Полікомпонентні	Комбіновані
1	2	3	4
Біфідовмісні	Біфідумбактерин в порошку (<i>B.bifidum</i>). Біфідумбактерин сухий (<i>B.bifidum</i>)	Біфікол (<i>B.bifidum</i> та <i>E. coli</i> M-17). Лінекс (<i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecium</i>). Біфіформ (<i>B. longum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>)	Біфіліз сухий (<i>B.bifidum</i> та лізоцим). Біфідумбактерин форте, Пробіфор (<i>B.bifidum</i> , адсорбовані на активованому вугіллі)
1	2	3	4
Лактовмісні	Лактобактерин	Ацилакт сухий (<i>L.</i>	Кіпацид (штами <i>L.</i>

	сухий (<i>L. plantarum</i> 8RA-3). Біобактон сухий (<i>L. acidophilus</i> 26), Гастрофарм (<i>L. bulgaricus</i> LB-51)	<i>acidophilus</i> – 3 штами)	<i>acidophilus</i> , які входять до складу препарату ацилакт, та лізоцим) Аципол (<i>L. acidophilus</i> та полісахарида кефірних грибків)
Колівмісні	Колібактерин сухий (<i>E. coli</i> M-17)	Біфікол сухий (<i>B. bifidum</i> та <i>E. coli</i> M-17)	Біфлор (<i>E. coli</i> M-17, що виросла на середовищі з екстрактами сої, овочів та прополіса)
Із інших видів бактерій	Споробактерин (<i>B. subtilis</i>). Бактиспорин (<i>B. subtilis</i>). Бактисубтил (<i>B. cereus</i>). Ентерол (<i>Saccharomyces boulardii</i>)	Біоспорин (<i>B. subtilis</i> та <i>B. licheniformes</i>)	Хілак форте, який містить концентрат продуктів метаболізму <i>L. acidophilus</i> та <i>L. helveticus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , молочну, фосфорну та лимонну кислоти

Таблиця 6. Основні групи пребіотичних препаратів

Група	Рістстимулююча речовина
Моносахариди, спирти	Ксиліт, мелібіоза, ксилобіоза, рафіноза, сорбіт тощо
Олігосахариди	Лактулоза, лацитол, соєвий олігосахарид, фруктоолігосахарид та ін.
Полісахариди	Пектини, декстрини, інουλін, хітозин та ін.
Ферменти	Мікробні бета-галактозидази, протеази сахароміцетів
Пептиди	Соєві, молочні
Амінокислоти	Валін, аргінін, глютамінова кислота та ін.
Антиоксиданти	Вітаміни А, С, Е, альфа- та бета-каротини, глутатіон та ін.
Ненасичені жирні кислоти	Ейкозопентаєнова кислота
Органічні кислоти	Пропіонова, оцтова, лимонна кислоти
Інше	Лецитин, параамінобензойна кислота, лактоферрин

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати властивості та механізм дії різних груп пробіотиків.
2. Проаналізувати технології отримання пробіотиків.
3. Визначити основні групи пребіотичних сполук.

Тема 10. Виробництво та застосування вакцин

Теоретичні відомості

Вакцини. При так названій «пасивній імунізації» в організмі виробляються антитіла до вірусів, бактерій або токсинів. «Активна імунізація», тобто – вакцинація, застосовується людиною вже більше 200 років, є значно більш ефективним способом стимуляції імунної системи. У відповідь на введення вакцини в організмі відбуваються такі процеси: активуються В-лімфоцити – продуценти антитіл; активуються Т-лімфоцити, які мають здатність знищувати чужорідний антиген; утворюються довгоживучі В- і Т-лімфоцити (клітини пам'яті), які швидко активуються при наступній зустрічі з тим же антигеном. В якості вакцини можуть слугувати інактивовані або послаблені (атенуйовані) мікроорганізми, які не є вірулентними, однак викликають імунну реакцію. Імунну відповідь викликають не тільки цілі клітини, але й окремі клітинні компоненти, наприклад полісахариди, а також токсичні сполуки. Для одержання атенуйованих мікроорганізмів розроблено цілий ряд спеціальних технологій. Протягом багатьох років вакцини застосовуються для профілактики таких захворювань людини, як кір, дифтерія, правець, кашлюк, туберкульоз, холера, поліомієліт і ін. На жаль, існує багато захворювань, проти яких до сих пір не отримано вакцин. До таких захворювань відносяться численні тропічні хвороби та СНІД. Крім того, знову стає актуальною профілактика деяких хвороб, які вже вважались переможеними. Методи генетичної інженерії дозволяють одержувати нові високоефективні вакцини.

Отримання вакцин. Традиційні методи виробництва вакцин ґрунтуються на одержанні інактивованих або послаблених антигенів у формі, доступній для парентерального, внутрішньом'язового або перорального застосування. В якості вакцини використовують, як правило, непатогенні штами, які, однак, викликають імунну відповідь. Для отримання такої форми штаму клітини вирощують у лабораторних умовах, а потім інактивують під дією формальдегіда або тепловою обробкою. Виробництво багатьох вакцин проти мікроорганізмів або їх токсинів здійснюється шляхом ферментації в біореакторах. До 1970 р. для культивування вірусів використовували курячі ембріони, а в якості вакцини застосовували білки вірусної оболонки. За сучасною технологією культури тваринних клітин в біореакторах заражають вірусами. Потім виділені із культури клітин віруси інактивують формальдегідом або тепловою обробкою. У зв'язку з ризиком інфікування всі етапи виробництва вакцин потребують суворішого дотримання техніки безпеки. Отримані препарати вакцин підлягають випробуванням на експериментальних тваринах.

Рекомбінантні вакцини. Методи генетичної інженерії відкривають нові можливості для створення вакцин. Поряд з одержанням чистих препаратів техніка рекомбінантних білків дозволяє розробляти цілком нові концепції імунізації, наприклад введення вакцини в клітину за допомогою білків оболонки непатогенних вірусів, експресія вакцини в трансгенних рослинах або в молочних залозах трансгенних тварин, а також імунізація шляхом трансфекції ДНК.

Сучасні вакцини, отримані з використанням методів генетичної інженерії, містять, як правило, не цілі клітини збудника захворювання, а їх компоненти, наприклад специфічні поверхневі білки. Такий підхід, безсумнівно, припускає знання імуногенної структури патогену. Іншим напрямом розвитку нового покоління вакцин є одержання атенуйованих штамів. «Векторні» вакцини – ще одна нова стратегія імунізації. В якості вакцини при такому підході використовується вірусна ДНК, модифікована таким чином, що вона більше не проявляє патогенної дії, однак викликає імунну відповідь.

Особливу групу генетичних вакцин складають ДНК-вакцини, які можуть використовуватись не тільки в профілактичних, але й в терапевтичних цілях для лікування деяких аутоімунних захворювань, алергічних станів, злоякісних новоутворень. ДНК-вакцини представляють собою генетичні структури або фрагменти ДНК, виділені з клітин патогенних мікроорганізмів, пухлинних клітин і ін.; вони відповідальні за синтез протективних антигенів мікроорганізмів, пухлиноасоційованих антигенів і ін., які викликають в організмі імунну відповідь. Такі генетичні структури за допомогою плазмідних або вірусних векторів трансфікуються в клітини людського організму, експресуються й синтезують пухлиноспецифічні, мікробні та інші білки (протективні антигени), що викликають імунну відповідь або активують захисні сили організму при тій чи іншій патології.

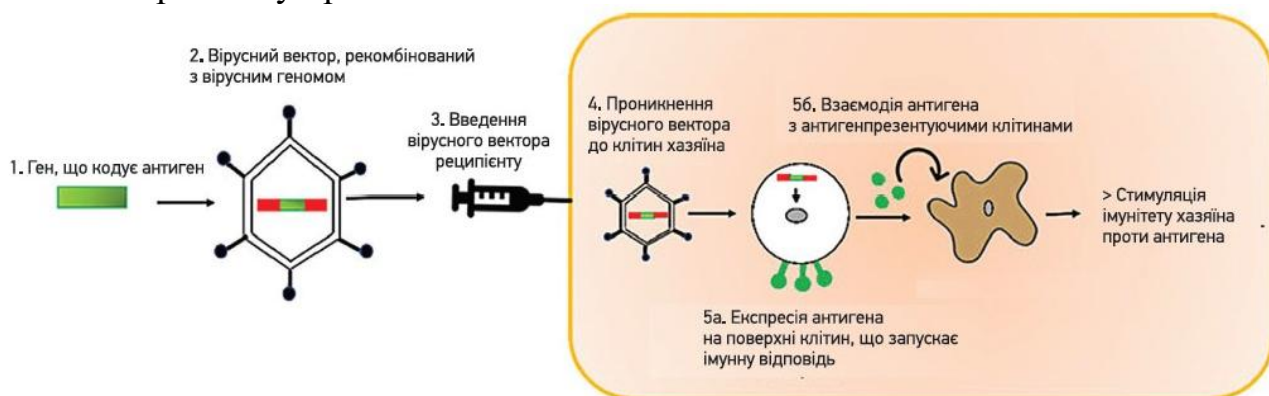


Рис. 10. Схема створення рекомбінантної вакцини

Контрольні завдання.

1. Охарактеризувати різні типи вакцин.
2. Проаналізувати технології отримання різних типів вакцин.
3. Визначити перспективи застосування вакцин у профілактиці захворювань.

Перелік питань для самостійного опрацювання матеріалу з дисципліни «Біомедичні технології»

Тема 1. Діагностика та генотерапія онкозахворювань, спадкових і неспадкових хвороб. Програма «Геном людини».

Тема 2. Стовбурові клітини різних типів – гемопоетичні, мезенхімальні, стромальні: технології одержання та застосування. Проблеми клітинної терапії. Реконструкція тканин: традиційні підходи, матрична тканинна регенерація.

Тема 3. Технології застосування каталітичних, афінних, клітинних біосенсорів. Переваги гелевих та ДНК біочіп-технологій.

Тема 4. Наночастки в медичній діагностиці. Створення нових наноносіїв і засобів доставки лікарських препаратів.

Тема 5. Рекombінантні терапевтичні білки людини: гормони, цитокіни, фактори згортання крові, ферменти. Рекombінантні білки, експресовані в клітинах рослин і тварин.

Тема 6. Діагностичні та терапевтичні моноклональні антитіла: особливості отримання й застосування.

Тема 7. Сучасні технології отримання ферментів та їх використання для діагностики й терапії.

Тема 8. Метаболічні шляхи біосинтезу антибіотиків мікроорганізмами. Проблеми антибіотикорезистентності. Принципи раціональної антибіотикотерапії.

Тема 9. Технології отримання сучасних препаратів пробіотиків і пребіотиків, їх застосування для корекції дисбіотичних станів.

Тема 10. Сучасні технології отримання вакцин і сироваток. Їх використання в діагностиці й профілактиці інфекційних захворювань.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Основні напрямки сучасних біотехнологій: посібник / А.С. Юет, Д.М. Гребіник, К.О. Дворщенко, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко. – К.: Електронне видання, 2023. – 390 с.
2. Abdelzaher, H. M., Gabr, A. S., Saleh, B. M., Abdel Gawad, R. M., Nour, A. A. and Abdelanser, A. RNA Vaccines against Infectious Diseases: Vital Progress with Room for Improvement. *Vaccines*, 9(1211), 2021, pp. 31–43.
3. Glick, B.R. and Patten, C.L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 6th ed. Washington DC by «ASM Press», 2022.
4. Lobato-Gómez, M., Hewitt, S., Capell, T., Christou, P., Dhingra, A. and Girón-Calva P. S. Transgenic and genome-edited fruits: background, constraints, benefits, and commercial opportunities. *Horticulture Research*, 8, 2021, pp. 166.
5. Li, Ying, Ai, Yuqing, Zhang, Junzheng, Fei, ingxuan, Liu, Bingnan, Wang, Jing, Li, Meng, Zhao, Qiancheng and Song, Jinzhu. A novel expression vector for *Corynebacterium glutamicum* with an auxotrophy complementation system. *Plasmid*, 107, 2020, pp. 102-176.
6. Milone, M. C. and O'Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 2018, pp. 1529–1541.
7. Park, J. W., Lagniton, P. N. P., Liu, Y. and Xu, R.-H. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int. J. Biol. Sci.*, 17, 2021, pp. 1446–1460.
8. *Omic technologies and bioengineering/* Edit by Debmaliya Barh, Vasco Arevedo, 2018. – 591 p.
9. Rahman, M. M., Zhou, N. and Huang, J. An Overview on the Development of mRNA-Based Vaccines and Their Formulation Strategies for Improved Antigen Expression in Vivo. *Vaccines*, 9(244), 2021, pp. 120–140.
10. Tatineni, S., Sato, S., Nersesian, N., Alexander, J., Quach, T., Graybosch, R. A. and Clemente, T. E. Transgenic Wheat Harboring an RNAi Element Confers Dual Resistance Against Synergistically Interacting Wheat Streak Mosaic Virus and Triticum Mosaic Virus. *Mol Plant Microbe Interact.*, 33(1), 2020, pp. 108–122.
11. Verbeke, R., Lentackera, I., De Smedta, S. C. and Dewitte, H. *Nano Today*, 2019, pp. 111-153.
12. Воронкова О.С., Скляр Т.В., Воронкова Ю.С., Зубарева І.М. Біотехнологія. Том 1. Загальна та мікробна біотехнологія: навч. посіб. Д.: ЛІРА, 2018.
13. Скляр Т.В., Гаврилюк В.Г., Лаврентьєва К.В., Курагіна Н.В., Дрегваль О.А., Голодок Л.П., Воробей Є.С. Навчальний посібник «Лабораторні методи в мікробіології, вірусології та біотехнології». - Дніпро.- 2021.-350 с.

