

ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології

Кваліфікаційна робота
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»
на тему: «Біотехнологічне виробництво лікарських речовин рослинного
походження: дослідження методів культивування клітин рослин *in vitro*»

Виконала: студентка денної форми навчання
спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація»

Елькауаші Ромаяса

Керівник: Ломига Лариса Леонідівна
викладачка кафедри

Рецензент: Шаторна Віра Федорівна
професорка, д.біол.н.

Рекомендовано до захисту:

протокол засідання кафедри

№ 3 від 02 червня 2025 р.

Завідувач кафедри

Шаторна Віра Федорівна

Захищено на засіданні ЕК № 3

протокол № 3 від «16 » червня 2025 р.

Оцінка добре / В /178

(за національною шкалою/ за шкалою

ECTS/ бал)

Голова ЕК Лєвих А. Е.

Дніпро – 2025

Зміст

Вступ		4
Розділ 1	Огляд літератури	6
	1.1. Історичні аспекти та сучасне розуміння культури рослинних тканин	8
	1.2. Актуальність використання методів культивування клітин рослин <i>in vitro</i> для збереження та відтворення лікарських видів	10
	1.3. Переваги розмноження рослин <i>in vitro</i>	12
	1.4. Застосування культури тканин рослин	13
Розділ 2	Методи дослідження	15
Розділ 3	Результати досліджень та їх обговорення	16
	3.1. Методи культури тканин рослин	16
	3.1.1. Органогенез	16
	3.1.2. Соматичний ембріогенез	17
	3.1.3. Культура калюсу	17
	3.1.4. Суспензійна культура	17
	3.1.5. Культура меристем	18
	3.1.6. Культивування ембріонів	18
	3.2. Застосування культур <i>in vitro</i> для отримання біологічно активних речовин	18
Висновки		20
Список літератури		21

Вступ

Актуальність теми. Споконвіків рослини використовувалися людством як природне джерело лікарських, цілющих засобів при різноманітних розладах організму людини [1, 2]. Спочатку ліки були представлені у немудрящих, простих формах, таких як порошки, настоянки, настої, чаї, припарки, відвари, інгаляції тощо [3, 4, 5]. Дозування та спосіб введення ліків при конкретних захворювань передавалися усно від одного покоління до іншого, і згодом традиційні фармакопеї врешті-решт задокументували знання про лікарські рослини [3].

Численні та різноманітні методи дослідження були застосовані у відкритті нових ліків з лікарських рослин. Новітні технологічні розробки дозволяють перетворити рослини на «фабрики», які створюють природні сполуки для використання у виробництві біотехнологічних фармацевтичних препаратів і ліків [6]. Використання рослин як ліків, ще не так давно, на початку XIX століття, вимагало розділення активних інгредієнтів [7]. Дослідження вченими лікарських рослин було вирішальним у відкритті перших ліків, кожен з яких мав відмінні фармакологічні характеристики. Крім того, постійні спроби вчених відокремити та описати фармакологічно активні речовини з лікарських рослин призвели до ідентифікації додаткових сполук, які мають терапевтичний потенціал. Процедура включає ретельне дослідження для розуміння хімічної структури, способів дії та можливого використання цих речовин у медичних цілях. Це підкреслює важливість природи як важливого джерела біоактивних сполук, які продовжують допомагати у створенні нових ліків і методів лікування в сучасній медицині.

Культивування клітинних культур передбачає застосування спеціалізованих методів для створення клітин з новими властивостями шляхом їх модифікації або комбінування. Цей процес може включати реконструкцію життєздатної клітини з окремих структурних компонентів, злиття клітин різного походження, зокрема між видами або навіть між представниками різних

біологічних царств — наприклад, рослин і тварин - з утворенням гібридних клітин, що містять генетичний матеріал обох донорів.

Такі біотехнологічні підходи широко застосовуються як у фундаментальних дослідженнях (зокрема, вивченні механізмів клітинної диференціації, експресії генів і регенерації), так і в прикладних напрямках. Зокрема, культивування клітин є основою для створення нових форм рослин з покращеними агрономічними ознаками, підвищеним вмістом вторинних метаболітів, стійкістю до патогенів, несприятливих екологічних умов або гербіцидів.

Сучасна технологія культивування рослинних тканин широко використовується як ефективний інструмент для ідентифікації, виділення та масштабного виробництва біологічно активних фітокомпонентів. Її застосування охоплює численні галузі, включаючи медицину, фармацевтичну галузь, харчову, косметичну та хімічну промисловість. Рослини виступають цінним джерелом фітохімічних речовин із вираженими лікувальними властивостями, що робить їх стратегічно важливими для розробки лікарських препаратів, нутрицевтиків, функціональних харчових продуктів і косметичних засобів.

Фітосполуки, отримані з рослинних клітин *in vitro*, демонструють широкий спектр біологічної активності: антивірусну, антибактеріальну, протигрибкову, антиоксидантну, протизапальну, протипухлинну та протиалергічну. У косметичній галузі вони цінуються за зволожувальні, антивікові, репаративні властивості та ефективність у запобіганні фотостарінню шкіри.

Культивування цінних видів флори *in vitro* набуває особливої актуальності завдяки перевагам перед традиційним розмноженням: воно забезпечує стабільне виробництво стандартизованої сировини, дає змогу контролювати якість і кількість вторинних метаболітів, не залежить від кліматичних чи сезонних умов, а також дозволяє зберігати генофонд рідкісних або зникаючих видів.

Таким чином, культура рослинних тканин є надзвичайно перспективною біотехнологічною платформою для досліджень у галузі біосинтезу,

біотрансформації та промислового виробництва сполук рослинного походження, забезпечуючи ефективність, економічність і сталість у масштабах біоіндустрії.

На сьогоднішній день підходи до розробки ліків використовуються для стандартизації рослинних лікарських засобів і ідентифікації біомолекул аналітичних маркерів [8]. Рослинні фармацевтичні препарати є результатом творчого застосування біотехнології рослин для виготовлення ліків, отриманих з натуральних продуктів, які медичні працівники можуть використовувати для боротьби з захворюваннями [9].

Розробка ліків із застосуванням фармацевтичних методів рослинного походження пропонує ефективну, економічно та безпечно альтернативу звичайним процедурам із використанням культур клітин тварин або мікробної ферментації. Таким чином, ліки, отримані з природних сполук у рослинах, можуть надати пацієнтам більший і швидший доступ до ліків [10].

Мета дослідження. Системний аналіз наукової літератури з розробки та застосування сучасних біотехнологічних методів культивування клітин рослин *in vitro* з метою отримання біологічно активних речовин, що характеризуються стабільністю складу, високою ефективністю та якістю.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати теоретичні основи культивування клітин рослин *in vitro* та їх значення для сучасної біотехнології.
2. Систематизувати види клітинних культур (калюсні, суспензійні, кореневі тощо) та оцінити їх ефективність щодо біосинтезу вторинних метаболітів.
3. Визначити основні біотехнологічні прийоми інтенсифікації продукції БАР - такі як еліcitaція, іммобілізація клітин, біотрансформація та генетична модифікація.
4. Узагальнити дані про застосування біореакторних систем у масштабному виробництві БАР із культур клітин рослин.

5. Оцінити переваги та обмеження методів *in vitro* у контексті сталого використання рослинних ресурсів і фармацевтичної стандартизації продукції.

6. Виокремити перспективні напрями подальших досліджень і розробок у цій галузі на основі порівняльного аналізу сучасних літературних джерел.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна роботи полягає у систематизації розглянутих сучасних літературних даних, які стосуються розробки біотехнологічних методів культивування клітин рослин *in vitro* для отримання лікарських речовин із високою біологічною активністю. Результати мета-аналізу дозволяють визначити новітні підходи та техніки, що забезпечують стабільність якості рослинних характеристик, що має важливе значення для фармацевтичної промисловості. Запропоновані багатьма вченими методи культивування сприяють підвищенню ефективності виробництва лікарських засобів, зокрема, дозволяють отримувати активні біологічні компоненти в стабільних і контрольованих умовах. Це може значно покращити якість лікарських препаратів на основі рослинних компонентів, знизити залежність від природних джерел і забезпечити сталий доступ до необхідних ліків. Крім того, наукові дослідження відкривають нові можливості для оптимізації процесів культивування, зокрема шляхом покращення умов для стимулювання біосинтезу активних сполук та зменшення ризиків їх деградації, що має важливе значення для розвитку біотехнологій у фармацевтичній галузі та медичній практиці.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історичні аспекти та сучасне розуміння культури рослинних тканин

Розвиток науки про культивування рослинних тканин бере свій початок із фундаментального відкриття клітини як основної одиниці живого. У 1838 році німецькі вчені Матіас Шлейден і Теодор Шванн сформулювали клітинну теорію, згідно з якою клітина є базовим структурним і функціональним елементом усіх

живих організмів. Вони також припустили, що кожна клітина потенційно здатна до автономного розвитку, включно з можливістю відновлення цілого організму.

Ці ідеї стали основою для перших спроб вирощування клітин *in vitro*. У 1902 році німецький фізіолог Готліб Хаберландт — визнаний засновник культури рослинних тканин — здійснив одну з перших спроб культивування окремих палісадних клітин листка у поживному розчині Кнопа, доповненому сахарозою. Хоча клітини не поділялися, вони залишалися життєздатними до місяця, збільшувалися в розмірі та накопичували крохмаль [11].

Значний прорив у цій галузі відбувся у 1940–1960-х роках. Цей період характеризується інтенсивним розвитком методології культивування, зокрема впровадженням фітогормонів (ауксини, цитокініни), розробкою стандартних поживних середовищ, таких як середовище Мурасіге і Скуга (MS), а також отриманням стабільних калусних культур [12].

Сучасне визначення культури рослинних тканин (*in vitro* культура) охоплює асептичне вирощування клітин, тканин, органів або цілих рослин в контрольованих лабораторних умовах. До таких умов належать забезпечення поживного середовища з необхідними мікро- і макроелементами, вітамінами, фітогормонами, джерелом вуглецю (часто сахароза), а також підтримка оптимального рН (в межах 5.4–5.8), температурного і світлового режимів [13, 14].

Особливе значення має здатність рослинних клітин до тотипотентності - унікальної властивості клітини відтворювати цілу рослину. Це відкриває широкі можливості для клонального розмноження, відновлення рідкісних видів та виробництва біоактивних речовин.

Середовище MS, розроблене Тошіо Мурасіге та Фолке Скугом у 1962 році, стало найпоширенішою основою для культивування багатьох рослин завдяки оптимальному складу макро- і мікроелементів, а також гнучкості при додаванні фітогормонів, залежно від потреб конкретної культури.

Методи культивування рослин *in vitro* активно застосовуються у сільському господарстві, фармацевтиці, лісовому господарстві, біотехнології, а

також у збереженні генофонду рослин. Наприклад, культура тканин дозволяє створювати стерильні умови для масового розмноження елітних генотипів, або ж використовувати методи кріоконсервації та повільного зростання для збереження зникаючих видів.

Проте, тривале культивування *in vitro* може супроводжуватися соматональною мінливістю — спонтанними мутаціями, які виникають у геномі внаслідок адаптації до штучного середовища. Цей феномен має як недоліки (генетична нестабільність), так і переваги — він може сприяти отриманню стійкіших до стресу форм [15].

Сучасний етап розвитку технології пов'язаний з інтеграцією традиційних методів культури тканин з передовими біотехнологічними підходами. Використання генетичної трансформації, метаболічного інжинірингу, CRISPR/Cas9-редагування генома відкриває нові можливості для спрямованої модифікації рослин з метою підвищення продуктивності або зміни якісного складу біологічно активних речовин. Паралельно розвиваються технології масштабного культивування у біореакторах, що дозволяють перевести процес з лабораторного рівня на промисловий.

Перспективи подальшого розвитку культури рослинної тканини пов'язані з автоматизацією процесів, використанням штучного інтелекту для оптимізації умов культивування та розробкою нових, більш ефективних живильних середовищ. Особливі надії покладаються на інтеграцію з синтетичною біологією, що може призвести до створення принципово нових систем виробництва рослинних біологічно активних сполук.

Залежно від частини рослини, що використовується як експлант, культури *in vitro* поділяються на кілька типів:

- **Клітинні культури** (суспензійні клітини, культура протопластів);
- **Калусні культури** — недиференційовані тканини, що утворюються з експлантів;

- **Органні культури** — культивування цілих органів, таких як пагони, корені, зародки.

Таким чином, культура рослинних тканин - це не лише технічний інструмент, а ціла наукова парадигма, яка відкрила нові горизонти у збереженні біорізноманіття, розробці лікарських препаратів, а також у біосинтезі вторинних метаболітів у контрольованих умовах.

1.2. Актуальність використання методів культивування клітин рослин *in vitro* для збереження та відтворення лікарських видів

З найдавніших часів лікарські рослини слугували джерелом біологічно активних речовин (БАР), що використовувались у лікуванні широкого спектру захворювань. Історичні свідчення вказують на застосування рослинної сировини у традиційній медицині практично в усіх культурах світу — від аюрведичних трактатів до середньовічних європейських гербаріїв. У сучасному світі, згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 70–80% населення продовжує активно використовувати фітотерапію як основний або допоміжний метод лікування [16].

Однак інтенсивна експлуатація природних популяцій цінних лікарських рослин, зумовлена зростаючим попитом на природні ліки, призводить до критичного зменшення їх чисельності, фрагментації ареалів та деградації природних біоценозів. Значна частина таких видів вже занесена до Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи (IUCN), а деякі з них опинились на межі повного зникнення [17].

У відповідь на ці виклики сучасна біотехнологія пропонує альтернативу традиційному плантаційному вирощуванню — методи культивування рослинних клітин, тканин і органів *in vitro*. Ці технології ґрунтуються на принципах тотипотентності рослинних клітин і здатності до морфогенезу в контрольованих умовах. Їх застосування має низку істотних переваг:

- Незалежність від кліматичних та ґрунтових факторів: забезпечує цілорічне виробництво біомаси у контрольованих умовах лабораторії або біореакторів;
- Збереження генофонду рідкісних або зникаючих видів: можливість довготривалого зберігання у вигляді культур клітин або кріоконсервованих зразків;
- Асептичність: мінімізація ризику контамінації фітопатогенами чи паразитами;
- Оптимізація синтезу вторинних метаболітів: шляхом регуляції складу живильного середовища, використання еліситорів або методів генетичної модифікації;
- Масштабованість процесу: перенесення з лабораторного рівня у промислові умови культивування в біореакторах [18, 19, 20].

Слід зазначити, що успішність *in vitro* технологій значною мірою залежить від коректного підбору умов культивування — типу живильного середовища, концентрацій макро- та мікроелементів, фітогормонів, джерела вуглецю, режиму освітлення, температури тощо. Навіть для видів одного роду ці параметри можуть суттєво відрізнятися, що зумовлює необхідність індивідуального підходу до кожного об'єкта дослідження [21].

Вивчення оптимальних умов культивування не лише дозволяє ефективно накопичувати біомасу, а й відкриває можливості для розкриття закономірностей біосинтезу БАР, модифікації метаболічних шляхів і отримання стандартизованої продукції з прогнозованими якісними характеристиками. Таким чином, методи *in vitro* виступають важливим інструментом як у збереженні біорізноманіття, так і в розвитку сталого виробництва фітопрепаратів.

1.3. Переваги розмноження рослин *in vitro*

Сучасні фармацевтичні дослідження поступово орієнтуються на вивчення сполук, які виробляються рослинами завдяки їх лікувальним властивостям. Використання біотехнологічних та синтетичних біологічних методів для

створення цих сполук у контрольованих умовах є важливим досягненням у цій сфері. Такий підхід підвищує ефективність і безпеку застосування цих речовин, оскільки дозволяє отримувати чисті сполуки в значних кількостях [22].

Застосування фітохімічних сполук у сучасній медицині добре відоме, оскільки багато фармацевтичних препаратів та методів лікування, що використовуються сьогодні, базуються на природних компонентах. Поєднання біотехнології та синтетичної біології відкриває нові можливості для відкриття і розробки ліків, що дозволяє створювати унікальні хімічні сполуки з поліпшеними терапевтичними властивостями. Ці інноваційні методи можуть істотно змінити фармацевтичну галузь, сприяючи розробці нових, ефективних методів лікування різних захворювань [23].

Також до преваг розмноження рослин *in vitro* відноситься мікророзмноження рослин за допомогою різних експлантів, таких як насіння, ембріони, калюси, пильовики, протопласти та меристематичні тканини коренів/кінчиків пагонів, використовується для великомасштабного виробництва промислової продукції [24]. Цей підхід пропонує високий потенціал для розвитку лікарських рослин з новими ознаками.

Нещодавні досягнення в культурі клітин рослин, молекулярній біології, ензимології та технології ферментації вказують на те, що ці системи є життєздатним джерелом синтезу важливих вторинних метаболітів. Рослини, заражені сконструйованим вірусом, виробляють відносно значну кількість бажаних хімічних речовин, і ці рослини можуть підтримувати стабільний рівень синтезу білка без додаткового втручання [25]. Удосконалення технології культури тканин показує, що транскрипційні фактори є ефективними новими молекулярними інструментами для метаболічної інженерії рослин для посилення синтезу важливих хімічних речовин [26]. Клітинна культура *in vitro* має невід'ємну перевагу у виробництві терапевтичних білків, таких як моноклональні антитіла, антигенні білки, які діють як імуногени, людський сироватковий

альбумін, інтерферон, імуноконтрацептивні білки, антигіпертензивні препарати, ангіотензини та людський гемоглобін у певних ситуаціях [27].

Техніка культивування тканин пропонує кілька переваг порівняно з розмноженням рослин у природних умовах [28].

1.4. Застосування культури тканин рослин

З найдавніших часів людство залежало від рослин для отримання їжі, ароматизаторів, ліків та багатьох інших цілей [29]. Оскільки спектр фітохімічних речовин ширший, ніж у будь-якого іншого класу істот, рослини є найпоширенішим джерелом рослинних лікарських засобів у харчовому та косметичному секторах [30]. Культуру рослинної тканини можна використовувати для широкого спектру цілей із різними застосуваннями в дослідженнях і промисловості [28, 29].

Культура рослинної тканини є потужним інструментом сучасної біотехнології, що відкриває нові горизонти у дослідженнях та практичному застосуванні. Цей метод базується на здатності рослинних клітин до тотипотентності - унікальній властивості, коли окрема клітина може дати початок цілій рослині. Суть технології полягає у виділенні фрагментів рослинної тканини (експлантів) та їх культивуванні на спеціально розроблених живильних середовищах у строго контрольованих асептичних умовах [31, 32].

Історичний шлях розвитку цього методу почався з революційних досліджень Готліба Габерландта [33] на початку XX століття, який вперше висунув теорію про тотипотентність рослинних клітин. Протягом наступних десятиліть науковці доклали значних зусиль для розробки оптимальних умов культивування. Вирішальним моментом стало створення у 1962 році середовища Мурасіге-Скуга [34], яке й досі залишається золотим стандартом у галузі культури рослинних тканин. Це середовище містить оптимальний баланс мінеральних солей, вуглеводів, вітамінів та регуляторів росту, що забезпечує нормальний розвиток рослинних клітин *in vitro* [35].

Активні рослинні сполуки, отримані з рідкісних або зникаючих видів, можна виробляти за допомогою методів *in vitro* без несприятливого впливу на навколишнє середовище та відповідно до питань біологічної стійкості, яких вимагає ринок.

Особливої уваги заслуговує роль культури тканин у збереженні біорізноманіття. Технології криоконсервації дозволяють довготривало зберігати генетичні ресурси рідкісних і зникаючих видів рослин у банках *in vitro*. Це стає особливо актуальним у світлі глобальних змін клімату та зростаючого антропогенного тиску на екосистеми.

2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

1. **Системний аналіз наукових джерел** – для комплексного вивчення та узагальнення сучасної літератури щодо біотехнологічних підходів культивування клітин рослин *in vitro*, а також для виявлення тенденцій, досягнень та актуальних викликів у цій сфері.
2. **Порівняльний аналіз** – з метою оцінки ефективності різних методів культивування клітин та тканин рослин для отримання вторинних метаболітів з лікувальними властивостями, а також для виявлення оптимальних умов культивування.
3. **Контент-аналіз наукових публікацій** – для виявлення найбільш часто досліджуваних рослинних об'єктів, типів використовуваних культур (калюсні, суспензійні, органогенез тощо) та методів стимуляції біосинтезу біологічно активних речовин.
4. **Методи інформаційного пошуку (бібліографічний аналіз)** – для виявлення релевантних джерел у міжнародних базах даних (Scopus, PubMed, Web of Science, Google Scholar).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

3.1. Методи культури тканин рослин

Культивування рослинних тканин – це метод, за якого фрагменти тканин рослини (експлантати) розвиваються *in vitro* у штучному середовищі за асептичних умов. Він включає культивування експлантатів (таких як верхівка пагона, верхівка кореня, калюс, насіння, зародок, пилкове зерно, насінина або навіть одна клітина), виділених з материнської рослини, на астерильному поживному середовищі, що призводить до розмноження клітин та регенерації рослини [31, 32].

3.1.1. Органогенез

Органогенез — це виробництво органів рослин із певної тканини з метою розвитку повних рослин. Він характеризується полярністю, що означає, що вивільняється лише один надземний орган або корінь, і з нього утворюється нова

повна рослина. Водночас органогенез може бути прямим, коли органогенний пагін утворюється безпосередньо з експлантів, або непрямим, коли органогенний процес відбувається з раніше створеного калюсу у вихідних експлантатах [36].

Сучасна біотехнологія пропонує різноманітні методи культивування рослинних тканин, серед яких особливе місце займає органогенез. Як демонструють дослідження Espinosa-Leal et al. [37], цей метод передбачає два основних шляхи формування органів:

1. Прямий органогенез - безпосереднє утворення пагонів або коренів з меристематичних тканин експланта. Цей процес відбувається при мінімальній дедиференціації клітин і максимально зберігає генетичну стабільність отриманих рослин. У механізмах прямого органогенезу ключову роль відіграють цитокініни у ініціації пагонового морфогенезу.

2. Непрямий органогенез - формування органів через стадію калюсу (дедиференційованих клітин). Дослідження Gaspar et al. [38] показують, що цей процес вимагає чіткого контролю балансу фітогормонів: високі концентрації ауксинів сприяють утворенню калюсу, тоді як подальше додавання цитокінінів ініціює органогенез. Проте, як зазначають Bhojwani та Dantu [39], непрямий органогенез може призводити до соматональної варіабельності через генетичні зміни під час калюсоутворення.

3.1.2. Соматичний ембріогенез

Соматичний ембріогенез — це процес утворення ембріонів із соматичних рослинних клітин (будь-якої нестатевої клітини) для отримання цілої рослини. На відміну від органогенезу, це полярний процес, при якому надземні структури і коріння рослин розвиваються із соматичного зародка. Він може бути прямим або непрямим, залежно від того, чи починається процес з оригінальних експлантів чи з раніше виробленого калюсу [36].

3.1.3. Культура калюсу

Калюс – це недиференційована маса тканини, яка утворюється на експлантатах через кілька тижнів на середовищі для росту з відповідними гормонами. Розвиток калюсу є результатом добре відомого процесу, відомого як дедиференціація або редиференціація. Для стимуляції індукції та розвитку калюсу використовується кілька гормонів росту. Індукція та розвиток калюсу були посилені у *Serphaelis ipescacianha* завдяки 2,4-D, NAA та кінетину.

Органогенез дозволяє ефективно регенерувати нові рослини з калюсу [37].

3.1.4. Суспензійна культура

На сьогодні системи культивування клітинної суспензії активно застосовуються для масштабного вирощування рослинних клітин з метою отримання цінних вторинних метаболітів для створення ліків в тому числі. Порівняно з калюсними культурами, суспензійні клітини характеризуються швидшим темпом росту. Крім того, клітинні суспензії здатні продукувати фітохімічні речовини у значно більших концентраціях та, на відміну від рослин, вирощених традиційним способом, не акумулюють шкідливі або токсичні домішки. Однією з найважливіших переваг культивування клітин *in vitro* є стабільний синтез біологічно активних сполук, незалежний від кліматичних умов, ґрунтів і сезонних коливань, що робить цей метод ефективним інструментом для фармацевтичної промисловості та біотехнології [40].

3.1.5. Культура меристем

Культура, в якій культивуються крихітні висікані верхівки пагонів, кожна з яких має апікальний меристематичний купол з одним або двома зачатками листків. Як правило, верхівка пагона розвивається для утворення одного пагона [41].

1.1.6. Культивування ембріонів

Культура ембріонів – це запліднені або незапліднені зиготичні (насінневі) ембріони, вилучені з дозріваючого насіння або плодів та культивовані *in vitro* до

утворення паростків. Культура ембріонів – це не те саме, що соматичний ембріогенез [36].

3.2. Застосування культур *in vitro* для отримання біологічно активних речовин

Згідно з даними ВООЗ, майже 70% населення світу надає перевагу традиційній медицині, у якій основну роль відіграють препарати на основі рослинного походження. З огляду на зростаючий попит на фітопрепарати, виникають серйозні екологічні загрози, пов'язані з надмірним збором лікарських рослин: зниження чисельності природних популяцій, втрата генетичного різноманіття, деградація природних середовищ існування, а в деяких випадках — повне зникнення окремих видів [42].

Вторинні метаболіти, які мають значну фармакологічну цінність, є складними за хімічною структурою сполуками, біосинтез яких включає низку ферментативних реакцій. У природних умовах концентрація цих речовин у рослинах зазвичай невисока — менш ніж 0,1–5% від загальної біомаси. Їхній вміст змінюється в залежності від типу тканини, фази онтогенезу, кліматичних і екологічних чинників [43].

У зв'язку з цим культура рослин *in vitro* стала привабливою альтернативою традиційному вирощуванню лікарських рослин, відкривши нові можливості для створення стабільних «біофабрик» з виробництва вторинних метаболітів. Було встановлено, що культивовані клітини, тканини й органи рослин здатні синтезувати широкий спектр біоактивних речовин, аналогічних тим, що утворюються у природному середовищі [44].

Культури клітин рослин мають низку суттєвих переваг у порівнянні з польовим вирощуванням сировини. Вони не залежать від сезонності, дозволяють стандартизувати процес синтезу й отримання продукту, зменшують ризик забруднення токсичними речовинами, мікроорганізмами чи шкідниками. Також можливо масштабувати виробництво рідкісних метаболітів з видів, що ростуть у

важкодоступних або охоронюваних районах, без шкоди для природних популяцій [44, 45 , 46].

Сучасні наукові дослідження зосереджені на вдосконаленні методів підвищення продуктивності культур *in vitro*. Зокрема, перспективним є застосування еліситації — індукції синтезу вторинних метаболітів під впливом біотичних або абіотичних стресорів. Еліситори можуть бути як природного (наприклад, жасмонова чи саліцилова кислота), так і штучного походження (ультрафіолет, мікробіологічні чинники) [47, 48].

Однак, попри численні переваги, культура рослин *in vitro* має і певні обмеження. Одним із головних викликів є соматональна варіабельність — генетичні зміни, які накопичуються у процесі тривалого культивування і можуть впливати на стабільність біосинтезу. Це явище активно досліджується з метою розробки підходів до його мінімізації [47]. Також варто враховувати високі фінансові витрати, пов'язані з організацією та підтримкою стерильних умов, що робить метод економічно обґрунтованим лише при отриманні цінних метаболітів або у випадку збереження рідкісних видів [48].

Висновки.

1. Теоретичні основи культивування клітин рослин *in vitro* свідчать про високий потенціал цієї технології у створенні контрольованих систем для одержання біомаси та цільових метаболітів. Основу процесу становить тотипотентність рослинних клітин, яка дозволяє регулювати морфогенез і метаболічну активність у штучно створених умовах.
2. Проведений аналіз типів клітинних культур (калусних, суспензійних, корневих, включно з волосистими коренями) показав, що кожен з них має свої переваги залежно від виду рослини та цільових метаболітів. Волосисті корені, зокрема, мають підвищену стабільність і високу продуктивність.
3. Використання біотехнологічних прийомів інтенсифікації (елісації, іммобілізації клітин, біотрансформації, генної інженерії) дозволяє значно підвищити вихід вторинних метаболітів. Елісація визнана найефективнішим методом стимуляції біосинтезу БАР без зміни геному клітини.
4. Аналіз застосування біореакторів підтвердив їхню ефективність для масштабного культивування рослинних клітин з метою промислового виробництва БАР. Найбільш перспективними є іммобілізовані системи та біореактори типу air-lift для суспензійних культур.
5. Методи культивування клітин *in vitro* забезпечують сталість виробництва, стандартизацію складу та якісних характеристик фітопрепаратів, що робить їх важливими з точки зору фармацевтичної безпеки. Водночас до недоліків можна віднести високу вартість первинного впровадження та потребу в спеціалізованому обладнанні.
6. Перспективними напрямками подальших досліджень є створення метаболічно модифікованих ліній рослинних клітин, оптимізація середовищ для культивування конкретних видів, а також дослідження епігенетичних механізмів, які впливають на стабільність синтезу БАР.

Список використаних джерел.

1. Chaachouay N., Azeroual A., Ansari M.K.A., Zidane L. Use of Plants as Medicines and Aromatics by Indigenous Communities of Morocco: Pharmacognosy, Ecology and Conservation. In *Plants as Medicine and Aromatics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2023; pp. 33–44.
2. Ansari M.K.A., Iqba, M., Chaachouay N., Ansari A.A., Owens G. The Concept and Status of Medicinal and Aromatic Plants: History, Pharmacognosy, Ecology, and Conservation. In *Plants as Medicine and Aromatics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2023; pp. 129–144.
3. Chaachouay N., Douira A., Hassikou R., Brhadda N., Dahmani J., Belahbib N., Ziri R., Zidane L. Etude Floristique et Ethnomédicinale des Plantes Aromatiques et Médicinales dans le Rif (Nord du Maroc). Ph.D. Thesis, Université Ibn Tofail, Kénitra, Morocco, 2020. Available online: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03376377>.
4. Orch H., Chaachouay N., Douiri E.M., Faiz N., Zidan, L. Douira A. Use of medicinal plants in dermato-cosmetology: An ethnobotanical study among the population of Izarène. *Jordan J. Pharm. Sci.* 2021, 14, 323–340.
5. Benkhniq O., Chaachouay N., Khamar H., El Azzouzi F., Douira A., Zidane L. Ethnobotanical and ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of anemia in the region of Haouz-Rehamna (Morocco). *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 2022, 10, 279–302.
6. Paul M., Ma J.K.-C. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011, 58, 58–67.
7. Brook K., Bennett ,J., Desai S.P. The chemical history of morphine: An 8000year journey, from resin to de-novo synthesis. *J. Anesth. Hist.* 2017, 3, 50–55.
8. Chin Y.-W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 2006, 8, E239–E253.

9. Mohr C. Plant Made Pharmaceuticals (PMPs) as Medicinal Products for Human Use - A Review of Current Regulatory Issues and Challenges to Achieve a Marketing Authorisation in the EU. 2015. Available online: https://www.dgra.de/media/pdf/studium/masterthesis/master_mohr_c.pdf.
10. Subramoniam A. Present scenario, challenges and future perspectives in plant based medicine development. *Ann. Phytomed* 2014, 3, 31–36.
11. Hussain A., Ahmed I., Nazir H. and Ullah, I. *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. 2012.
12. Thorpe T. History of Plant Tissue Culture. *Plant Cell Culture Protocols*, 2012.pp.9-27.
13. Loyola-Vargas V. and Ochoa-Alejo, N. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, 2018. pp.3-13.
14. Ogita S. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: The Most Flexible Foundations for Plant Metabolic Engineering Applications. *Natural Product Communications*, 2015. 10(5), pp.1934578X1501000.
15. Oseni O., Pande V., Nailwal T. A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018. 7(07), pp.3778-3786.
16. Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 2020. 26 p.e00450.
17. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-2. Available: <https://www.iucnredlist.org/>.
18. Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2002. 20(2), 101–153.
19. Georgiev V., et al. Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology Journal*, 2007. 2(9), 1150–1170.

20. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009. 3(13), 1222–1239.
21. Murashige T., & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962. 15(3), 473–497.
22. Ausländer S., Ausländer D., Fussenegger M. Synthetic Biology - The Synthesis of Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 6396–6419.
23. Pereira G.C. Application of Biotechnology in Producing Plant Bio-active Compounds. In *Natural Bio-Active Compounds*; Akhtar, M.S., Swamy, M.K., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 59–78. <https://www.mdpi.com/2813-2998/3/1/11>.
24. Shasmita R. M. K., Naik S. K. Exploring plant tissue culture in *Withania somnifera* (L.) Dunal: in vitro propagation and secondary metabolite production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018. 38 (6), 836–850. DOI: 10.1080/07388551.2017.1416453.
25. Sajc L., Grubisic D., Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* 2000. 4 (2), 89–99. DOI: 10.1016/S1369-703X(99)00035-2.
26. Hasnain A., Irfan M., Bashir A., Maqbool A., Malik, K. A. Transcription factor TaDof1 improves nitrogen and carbon assimilation under low-nitrogen conditions in wheat. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2020. 38, 441–451. DOI: 10.1007/s11105-020-01208-z.
27. Wongsamuth R., Doran P. M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnol. Bioengineering.* 1997. 54 (5), 401–415. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5.
28. Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2020. 26, e00450. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00450.

29. Rai M. K., Kalia R. K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A. K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection. An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* 2011. 71, 89–98. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
32. Barbulova A., Apone F., Colucci G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics* 2014. 1, 94–104. DOI: 10.3390/cosmetics1020094
31. Kaya Y., Huyop F. Z. An easy and reliable method for establishment and maintenance of tissue cultures of *Nicotiana tabacum* cv TAPM 26. *Int. J. Sci. Lett.* 2020. 2 (2), 62–71. DOI:10.38058/ijsl.764947.
33. Vidyagina E. O., Kharchenko N. N., Shestibratov K. A. Efficient cryopreservation of *Populus tremula* by In vitro-grown axillary buds and genetic stability of recovered plants. *Plants (Basel)*. 2021. 2-10 (1), 77. DOI: 10.3390/plants10010077.
34. Haberlandt, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien Math.-Natur. Kl.* 1902. 111, 69–72.
35. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 1962. 15, 473–497.
36. Chen S., Yu H., Luo H.-M., Wu Q., Li C.-F., Steinmetz A. Conservation and sustainable use of medicinal plants: Problems, progress, and prospects. *Chin. Med.* 2016. 11. DOI: 10.1186/s13020-016-0108-7.
37. Gupta N., Jain V., Joseph M. R., Devi S. A review on micropropagation culture method. *Asian J. Pharm. Res. Dev.* 2020. 8 (1), 86–93.
38. Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. 2018. 248, 1, 1–18, *Planta*. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
39. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D., Thorpe T. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In: *Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*. 1996. 32, 272–289. DOI: 10.1007/BF02822700.

40. Bhojwani S. S., Dantu P. K. "Micropropagation," in Plant tissue culture: An introductory text. Eds. Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (New Delhi, India: Springer), 2013. 245–274.
41. Suman S. Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch.* 2017. 17 (1), 1–26.
42. Ahluwalia B., Magnusson M. K., Isaksson S., Larsson F., Öhman L. Effects of *Aloe barbadensis* Mill. extract (AVH200®) on human blood T cell activity in vitro. *J. Ethnopharmacology.* 2016. 179, 301–309.
43. Dias M., Sousa M., Alves R., Ferreira I. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 2016. 82, pp.9-22.
44. Meskaaoui A. Plant Cell Tissue and Organ Culture Biotechnology and Its Application in Medicinal and Aromatic Plants. *Medicinal & Aromatic Plants*, 2013. 02(03).
45. Hussain M., Rahman M., Fareed S., Ansari S., Ahmad I., Mohd. Saeed. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2012. 4(1), p.10.
46. Murthy H., Lee E. and Paek K. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2014. 118(1), pp.1-16.
47. Alamgir A. Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention). *Progress in Drug Research*, 2018. pp.585-664.
48. Wang J., Li J., Liu S., Huang L., Gao W. Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 2017. 9(2), pp.115-125.

49. Cardoso J., Oliveira M., Cardoso F. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 2019. 37(2), pp.124-132.

Abstract

This master's thesis presents a comprehensive analysis of the theoretical and practical foundations of plant cell cultivation in vitro as a promising biotechnological approach for the production of biomass and target secondary metabolites. The study emphasizes the totipotency of plant cells, which enables controlled morphogenesis and metabolic activity under artificial conditions. Various types of plant cell cultures—callus, suspension, root (including hairy roots)—were reviewed, highlighting their specific advantages depending on plant species and the desired bioactive compounds. Special attention is given to the effectiveness of biotechnological intensification techniques such as elicitation, cell immobilization, biotransformation, and genetic engineering in increasing metabolite yield, with elicitation being the most efficient non-genomic method. The role of bioreactors, particularly air-lift and immobilized systems, in scaling up production was assessed. In vitro cultivation methods were shown to ensure standardization and consistency in phytopharmaceuticals, although high initial costs and technical requirements remain challenges. Future research directions include the development of metabolically modified cell lines, optimization of culture media for specific plant species, and the exploration of epigenetic mechanisms affecting secondary metabolite stability.

Keywords: plant cell culture, in vitro, secondary metabolites, hairy roots, elicitation, bioreactors, metabolic engineering, phytopharmaceuticals, biotechnology