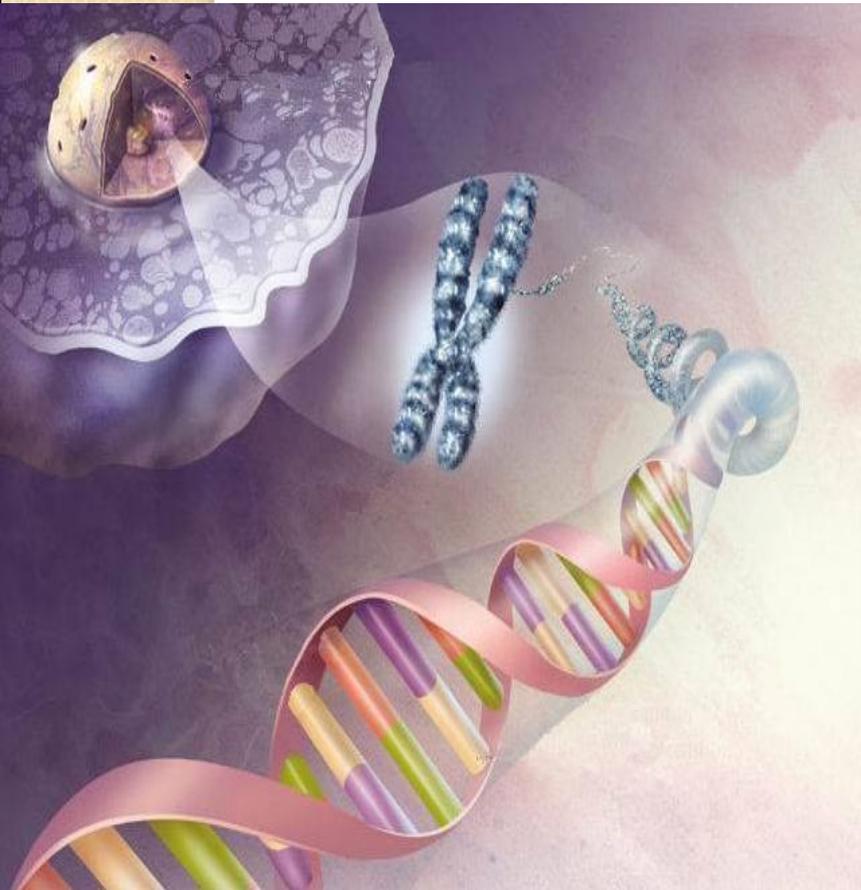


Лекция № 7.
Антибиотики и основы
биотехнологии.

Лектор:
доцент кафедры, к.м.н.
Темникова Н.В.



Биотехнология – использование в производстве живых организмов и биологических процессов



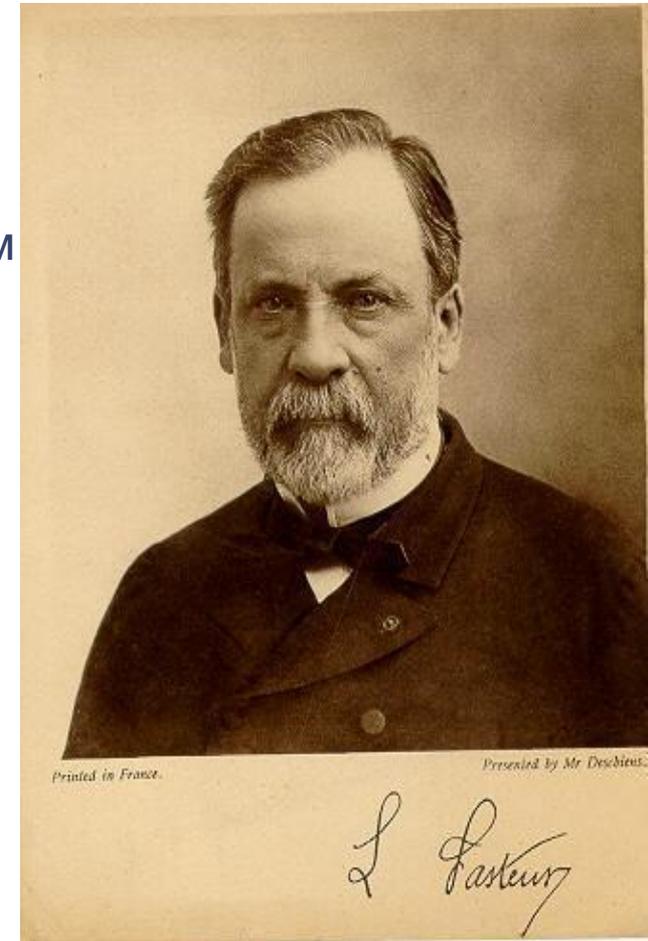
В традиционном, классическом, понимании биотехнология - это наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов:

- ***микроорганизмов, растительных и животных клеток***
- ***частей клеток , клеточных мембран, рибосом***
- ***и различных процессов***

Корни биотехнологии уходят в далёкое прошлое и связаны с хлебопечением, виноделием и другими способами приготовления пищи, известными человеку еще в древности.

Например, такой биотехнологический процесс, как брожение с участием микроорганизмов, был известен и широко применялся еще в древнем Вавилоне, о чем свидетельствует описание приготовления пива, дошедшее до нас в виде записи на дощечке, обнаруженной в 1981 г. при раскопках Вавилона.

Наукой биотехнология стала благодаря исследованиям и работам французского ученого, основоположника современной микробиологии и иммунологии Луи Пастера (1822-1895).





в XX веке происходило бурное развитие молекулярной биологии и генетики с применением достижений химии и физики.

Важнейшим направлением исследований явилась разработка методов культивирования клеток растений и животных. И если еще совсем недавно для промышленных целей выращивали только бактерии и грибы, то сейчас появилась возможность не только выращивать любые клетки для производства биомассы, но и управлять их развитием, особенно у растений.

Таким образом, новые научно-технологические подходы воплотились в разработку биотехнологических методов, позволяющих манипулировать непосредственно генами, создавать новые продукты, организмы и изменять свойства уже существующих.

В 70-е годы появились и активно развивались такие важнейшие области биотехнологии, как генетическая (или геновая) и клеточная инженерия, положившие начало «новой» биотехнологии, в отличие от «старой» биотехнологии, основанной на традиционных микробиологических процессах.

Генная и клеточная инженерия

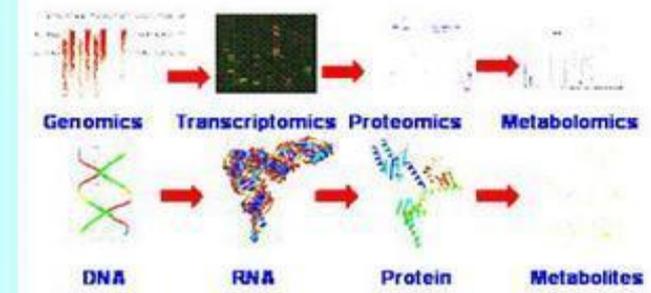
Генная и клеточная инженерия – являются важнейшими методами (инструментами), лежащими в основе современной биотехнологии. Методы клеточной инженерии направлены на конструирование клеток нового типа. Они могут быть использованы для воссоздания жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, для объединения целых клеток, принадлежавших различным видам с образованием клетки, несущей генетический материал обеих исходных клеток, и других операций.

Генно-инженерные методы направлены на конструирование новых, не существующих в природе сочетаний генов. В результате применения генно-инженерных методов можно получать рекомбинантные (модифицированные) молекулы РНК и ДНК, для чего производится выделение отдельных генов (кодирующих нужный продукт), из клеток какого-либо организма.

После проведения определенных манипуляций с этими генами осуществляется их введение в другие организмы (бактерии, дрожжи и млекопитающие), которые, получив новый ген (гены), будут способны синтезировать конечные продукты с измененными, в нужном человеку направлении, свойствами.

Иными словами, генная инженерия позволяет получать заданные (желаемые) качества изменяемых или генетически модифицированных организмов или так называемых «трансгенных» растений и животных.

Основные фундаментальные направления исследований в нанобиотехнологии



- 1. Геномика**
 - Создание генструктур
 - Генетическая инженерия
 - Получение трансгенных биообъектов с заданными свойствами
- 2. Протеомика**
 - Выделение и манипуляции с белками, пептидами и аминокислотами
 - Белковая инженерия
- 3. Метаболомика**
 - Комплексное изучение метаболома и его изменчивости
 - Метаболическая инженерия, модификация и иммобилизация
- 4. Нано-био-сенсоры**
 - Конструирование дизайн нанобиоструктур
 - Изучение и характеристика
 - Создание тест-систем для контроля качества, оценки безопасности, тестирования и индикации
- 5. Нанобио-материаловедение**
 - Создание специализированных материалов
 - Исследование их возможностей и опасностей

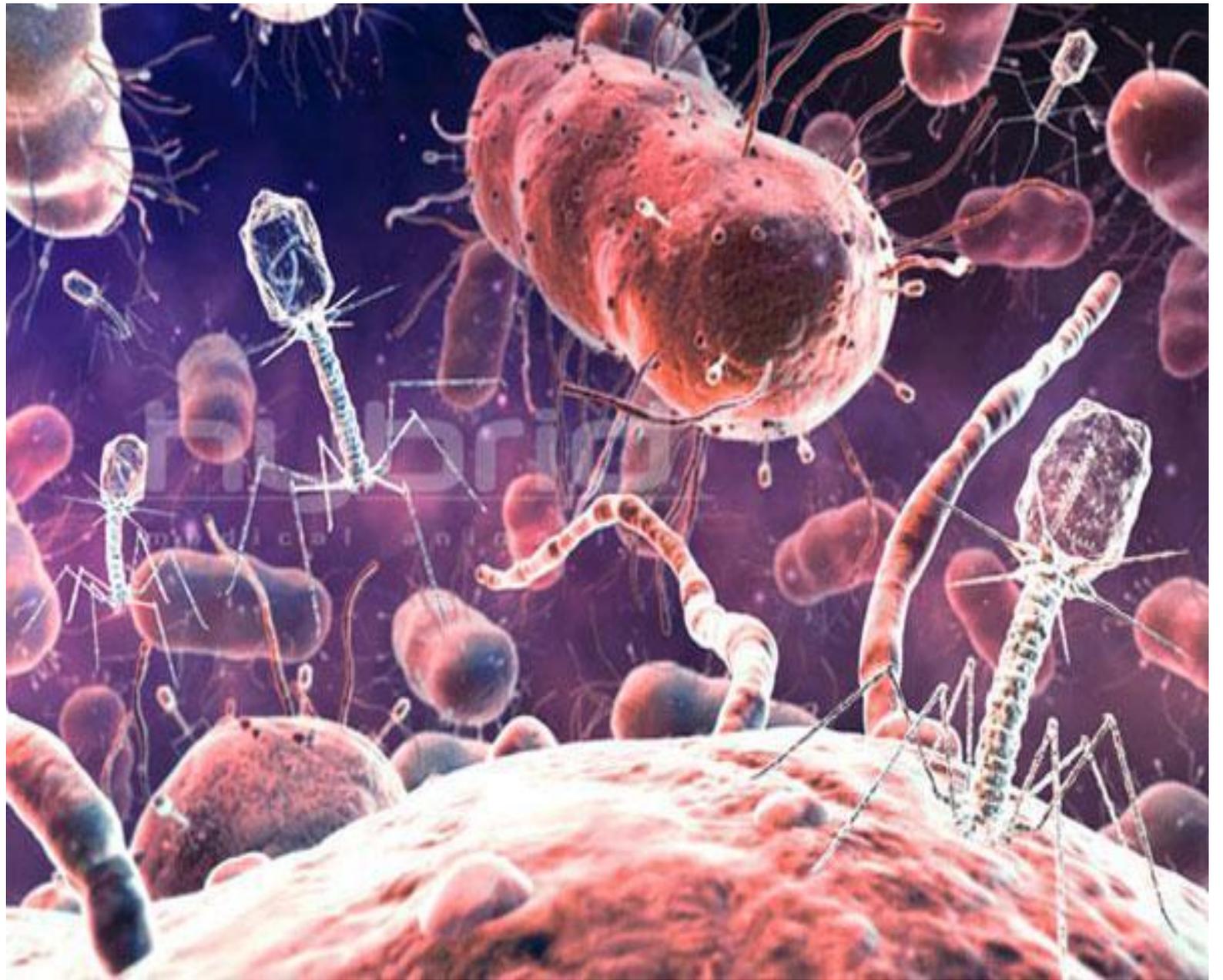


Основные принципы биотехнологии:

- ферментация;
- культивирование микроорганизмов, растительных и животных клеток;
- генная и клеточная инженерия.

Методы:

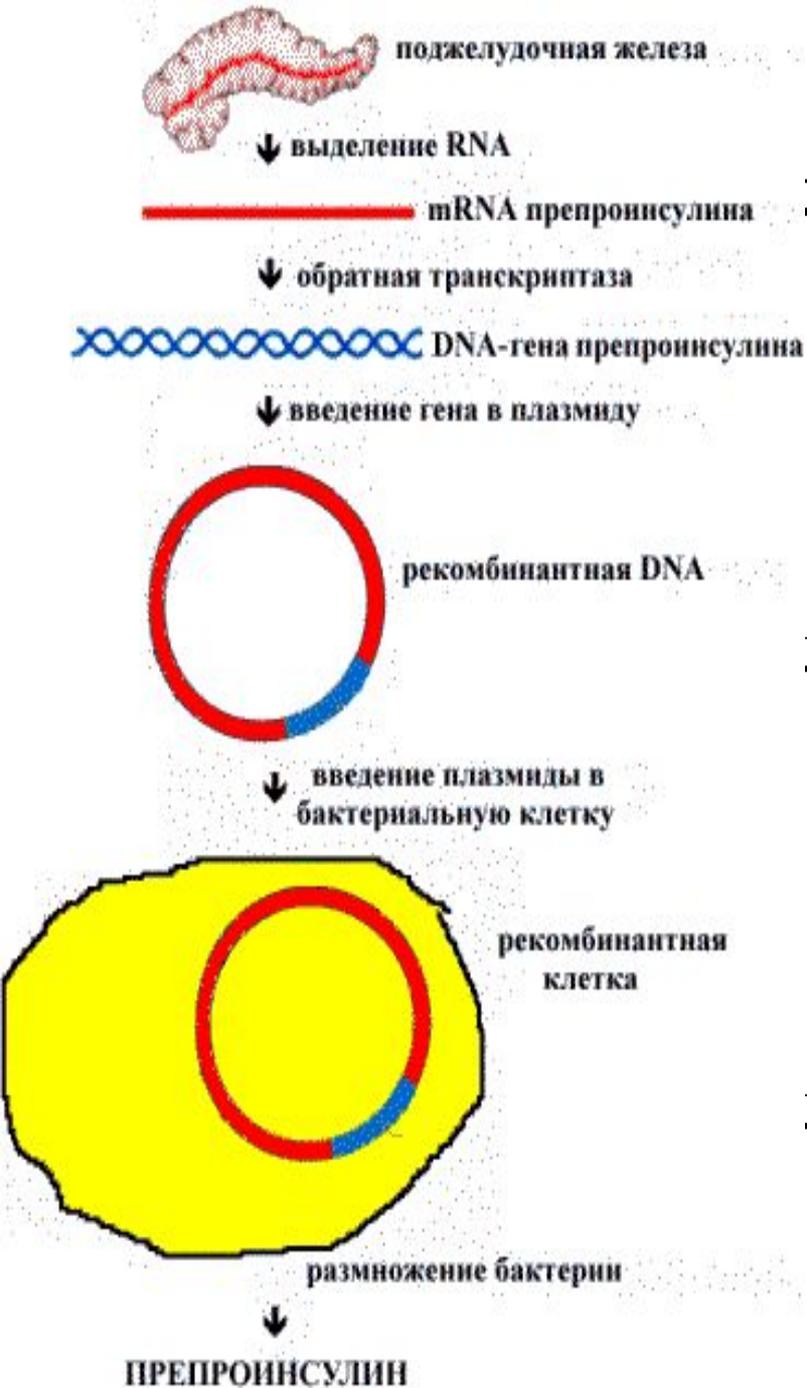
- ❖ Использование ферментов – рестриктаз (эндонуклеаз), ДНК-лигаз, ДНК-полимераз, обратной транскриптазы в генной инженерии и молекулярной диагностике.
- ❖ Плазмиды (F) и бактериофаги – **векторы** для переноса генов.
- ❖ **Метод клонирования** – ДНК фрагмент (ген) вводят в состав самореплицирующей системы и накапливают в размножающихся клетках. Микроорганизмы – продуценты биологически активных веществ (вакцины).
- ❖ **Гибридомная (клеточная) технология** – для получения **моноклональных антител (МКА)**.



Для чего ОНА нам нужна????

- В конце 90-х годов XX в. учёные США вплотную подошли к получению сельскохозяйственных животных методом клонирования клеток эмбрионов, хотя это направление нуждается еще в дальнейших серьезных исследованиях.
- ❖ А вот в ксенотрансплантации – пересадке органов от одного вида живых организмов другому, - достигнуты несомненные результаты. **Наибольшие успехи получены при использовании свиней, имеющих в генотипе перенесенные гены человека, в качестве доноров различных органов.** В этом случае наблюдается минимальный риск отторжения органа.
- ❖ Учёные также предполагают, что перенос генов поможет снизить аллергию человека к коровьему молоку.
- ❖ **С помощью биотехнологии могут быть получены новые диагностические средства, вакцины и лекарственные препараты.**

- Показана схема получения рекомбинантных ДНК и рекомбинантных штаммов микробов. Из рис.6.1 видно, что клонированный (т.е. выделенный из ДНК клетки) природный или химически синтезированный ген целевого продукта (например, инсулина, интерферона) встраивается в ДНК (например, в плазмиду какой-либо бактерии или в ДНК вируса) после расщепления ДНК с помощью ферментов рестриктаз. Вставленный в расщепленную ДНК ген «сшивается» с этой ДНК с помощью ферментов лигаз. Полученная рекомбинантная ДНК бактерий или вируса затем вводится в эту же микробную клетку или вирусную частицу, из которой была взята, и таким образом получают рекомбинантный штамм бактерий или вирусов. При культивировании рекомбинантного штамма в процессе роста и размножения этот штамм синтезирует не свойственный ему продукт, кодируемый встроенным чужеродным геном (например, инсулин, интерферон).
На этом принципе в настоящее время получены сотни рекомбинантных штаммов бактерий, дрожжей, вирусов, способных продуцировать разнообразные биологически активные вещества: антигены, антитела, ферменты, гормоны, иммуномодуляторы и др.



Значение биотехнологий для медицины

На основе генной инженерии возникла целая отрасль фармацевтической промышленности, называемая “индустрией ДНК” и представляющая собой одну из современных ветвей биотехнологии. Более четверти всех лекарств, используемых сейчас в мире, содержат ингредиенты из растений.

Генно-модифицированные растения и животные являются дешевым и безопасным источником для получения полностью функциональных лекарственных белков (антител, вакцин, ферментов и др.) как для человека, так и для животных. Пример: производство чел. инсулина путем использования генно-мод-ных бактерий.

Генетическая паспортизация (иссл-ние и анализ генотипа человека, для определения предрасположенности к различным инфекционным и не инфекционным заболеваниям...

Биотехнологии - технологии, использующие живые организмы или продукты их жизнедеятельности в производстве и переработке различных продуктов

Экологические

Промышленные
(стиральные порошки)

Аграрные (силос,
ГМ растения)

Медицинские

Диагностические
(ИФА, ПЦР)

Лечебные

Вакцины

Терапия

Белки

ДНК

Белки

ДНК

Моноклональные антитела

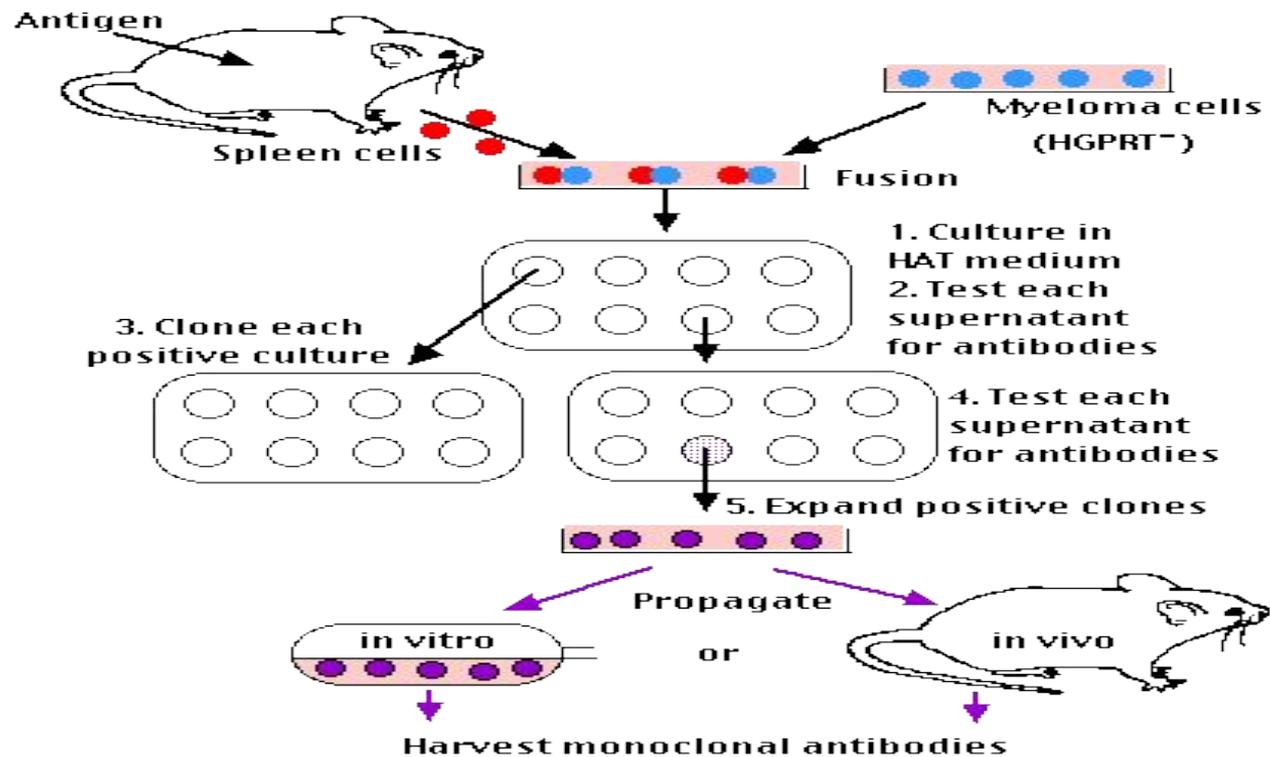
Это антитела Это антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы.

- Моноклональные антитела могут быть выработаны на почти любое вещество (в основном белки Моноклональные антитела могут быть выработаны на почти любое вещество (в основном белки и полисахариды), которое антитело будет специфически связывать.
- Они могут быть далее использованы для детекции (обнаружения) этого вещества .

- В 1970-е годы уже были известны опухолевые B-лимфоциты В 1970-е годы уже были известны опухолевые В-лимфоциты (клетки миеломы В 1970-е годы уже были известны опухолевые В-лимфоциты (клетки миеломы), которые синтезировали один и тот же тип антител (парапротеин В 1970-е годы уже были известны опухолевые В-лимфоциты (клетки миеломы), которые синтезировали один и тот же тип антител (парапротеин). Эти клеточные культуры использовались для изучения строения молекулы антитела, но не было методики, позволявшей продуцировать идентичное антитело к заданному антигену.
- Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном в 1975 Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном в 1975 годах. [1] Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном в 1975 годах. [1] За это изобретение в 1984 Процесс получения моноклональных антител был изобретён Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном в 1975 годах.

Схема получения МКА

(по John W. Kimball's online biology textbook)



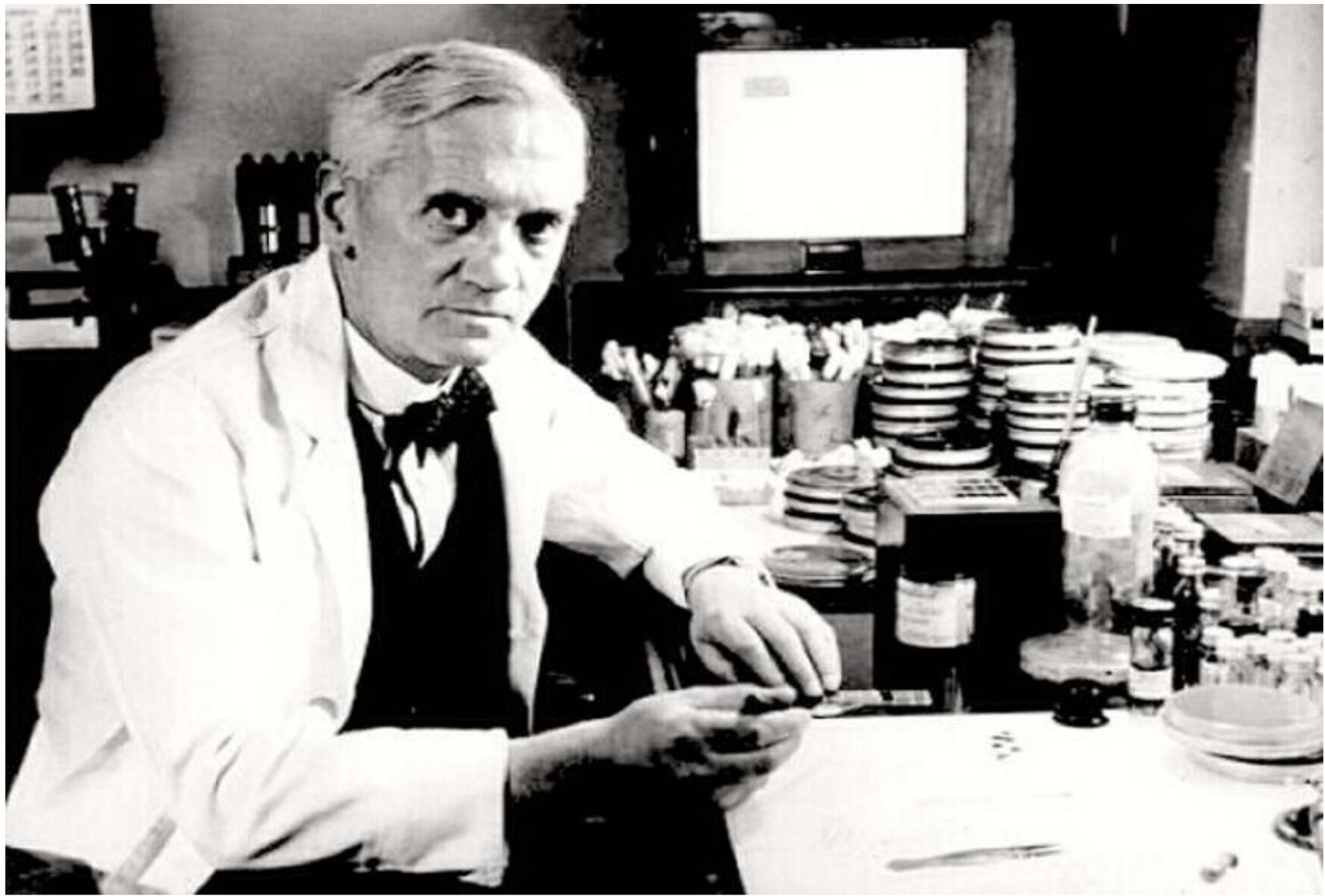
Предшественники антибиотиков

1891 г.- Д.А.Романовский - основоположник химиотерапии, хинин для лечения малярии.

1906 г. - П. Эрлих принцип химической вариации, синтезировал **сальварсан** и **неосальварсан** (спирохетоцидное действие).

1932 г.- синтезирован первый сульфаниламидный препарат – стрептоцид (антиметаболит).

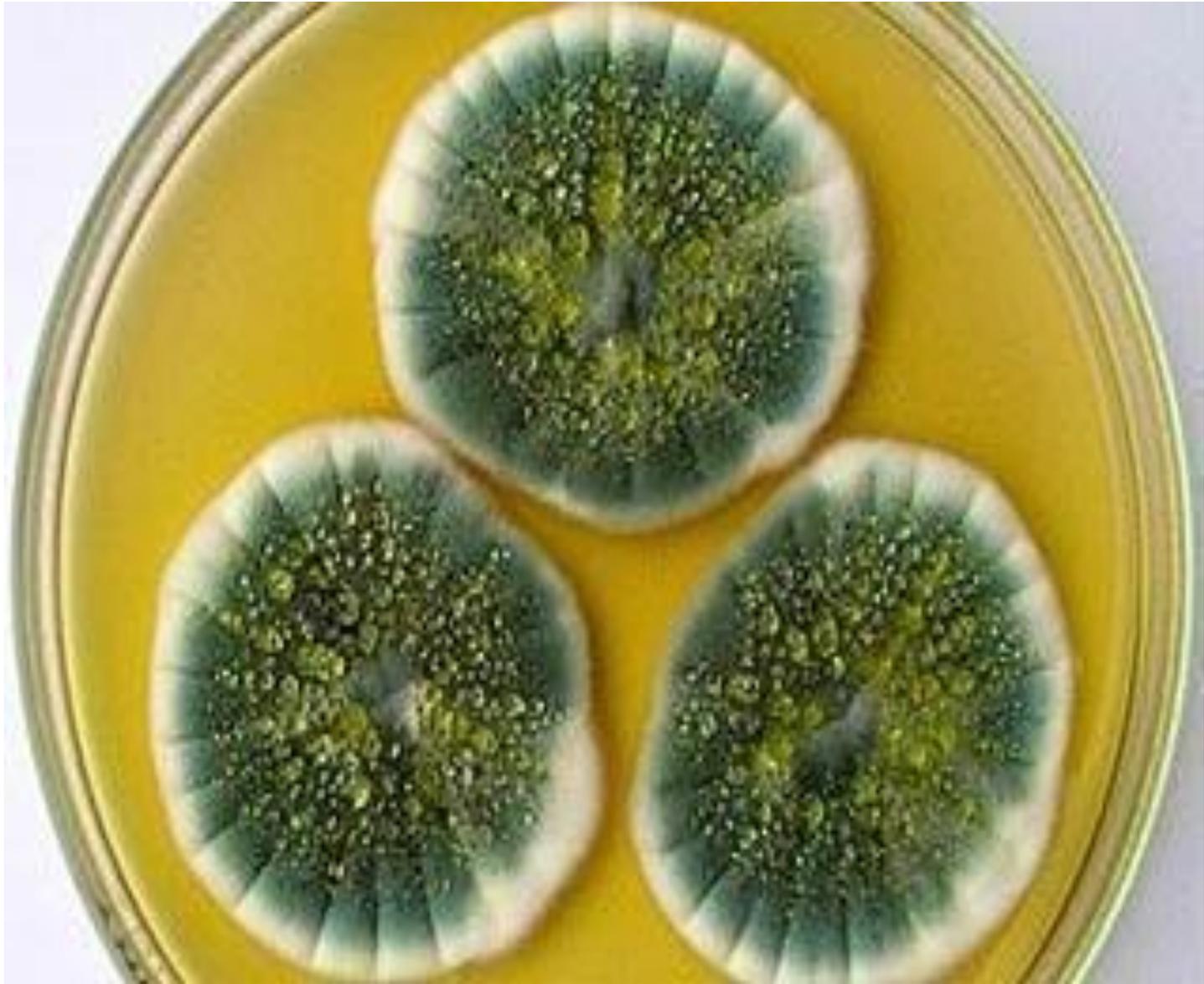




Мудрый царь Соломон, говорил, что **три вещи неподвластны его разуму: путь орла в небе, змеи на камне и мужчины к сердцу женщины.**



- Также трудно бывает проследить и путь научной истины и знания.
- Кто бы мог подумать, что талантливый еврейский мальчик-музыкант, отец которого был выходцем из России, а мать немкой, в конечном итоге бросит стезю профессионального пианиста и найдет совершенно иной путь к всемирной славе. Речь идет об Эрнесте Каине, которого мы знаем под его англицированным именем Чейн.
- Чейн предлагает Г. Флори сконцентрироваться на более обещающем пенициллине, открытом тем же А. Флемингом семью годами позже.
- Сам А. Флеминг был скептически настроен к своему детищу, заявив, что «этим не стоит заниматься». Не только ему, но и более известному биохимику Дж. Рейстрику не удалось выделить достаточно стабильный «экстракт».



Организаторы первого промышленного производства пенициллина, понимали, что флеминговская плесень не может быть самой урожайной в мире.

Военные пилоты везли образцы грибка со всего света. Обратились за помощью и к местным жителям. С особым энтузиазмом отнеслась к призыву дама по имени Мэри Хант. Летом 1943-го мисс Хант нашла на рынке гнилую дыню-кенталупу с великолепной золотистой плесенью *Penicillium chrysogenum* — смесью разных штаммов, один из которых оказался на редкость плодовитым.

Генетики увеличили урожайность грибка, облучив его ультрафиолетом. И до сих пор весь пенициллин в мире вырабатывают потомки плесени с этой кенталупы.

Результаты были поразительны. Если потери фашистов оставались на уровне 1914 года (150 раненых из 1 000 гибли от гангрены), то у союзников смертность от гангрены прекратилась вообще. **Тяжелораненые избегали ампутации и возвращались в строй за месяц.**



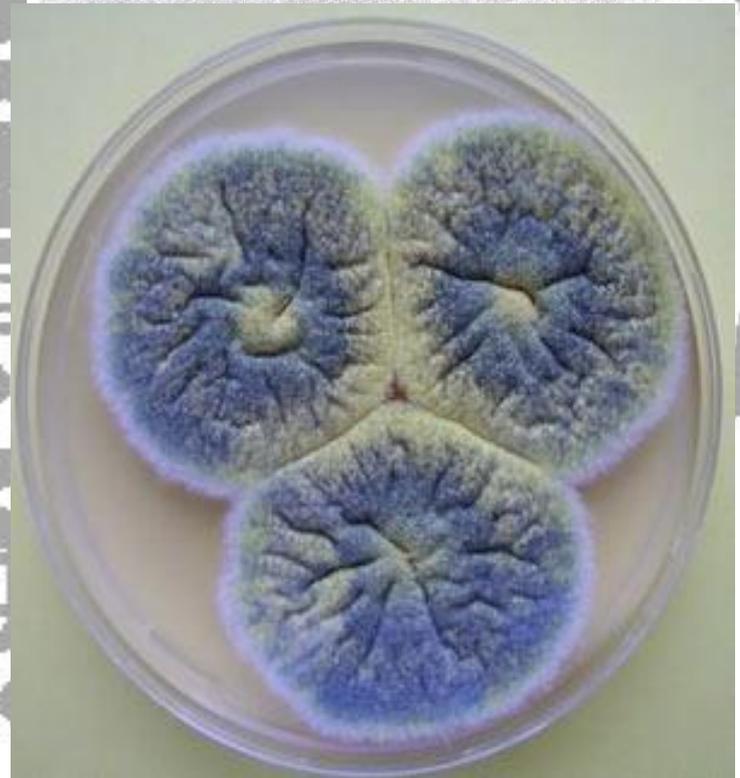
Статья Флори об испытании препарата на мышах была прочитана спустя год статью заметили в Советском Союзе.

- ❑ Отечественными исследованиями антибиотиков руководила Зинаида Виссарионовна Ермольева — знаменитый специалист по борьбе с холерой. Через Наркомздрав она просила у союзников образец плесени, с которой работал Флеминг. Англичане сначала тянули с ответом, затем сообщили, что исследования ведутся в США, и посоветовали обратиться туда.

Но и американские коллеги не торопились поделиться «сокровищем»... «Устав от напрасного ожидания, весной 1942 года я с помощью друзей стала собирать плесени из самых различных источников. Этот штамм был идентифицирован как «близкий к *Penicillium crustosum*». Из него мы и стали получать советский препарат, который называли «пенициллин-крустозин ВИЭМ». Проверив безвредность антибиотика на себе, сотрудники Всесоюзного института экспериментальной медицины (ВИЭМ) передали его для клинических испытаний.

АНТИБИОТИКИ

- низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, подавляющие в малых концентрациях рост других микроорганизмов (не превышают несколько дальтон).



Классификация по происхождению

- Природные (пенициллин)
- Синтетические (химические производные природных АБ)
- Полусинтетические (получены путем модификации природных)

Природные

- полученные из бактерий и актиномицетов
- из грибов(пенициллин)
- из растительных клеток (чеснок)
- ИЗ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Классификация АБ по спектру:

- препараты широкого спектра действия (ГР+ и ГР-)
- узкого спектра действия
- С избирательностью тесно связано понятие о широте спектра активности антибактериальных препаратов. Однако с позиций сегодняшнего дня деление антибиотиков на препараты широкого и узкого спектра действия представляется условным и подвергается серьезной критике, в первую очередь из-за отсутствия критериев для такого деления.
- Ошибочным является представление о том, что препараты широкого спектра активности более «надежны», более «сильны», а применение антибиотиков с узким спектром в меньшей степени способствует развитию резистентности и т.д.
- При этом не учитывается приобретенная резистентность, вследствие чего, к примеру, тетрациклины, которые в первые годы применения были активны в отношении большинства клинически значимых микроорганизмов, в настоящее время потеряли значительную часть своего спектра активности именно из-за развития приобретенной резистентности у пневмококков, стафилококков, гонококков, энтеробактерий.

Классификация

по направленности действия

- антибактериальные
- противогрибковые
- противовирусные
- противопротозойные
- противоопухолевые

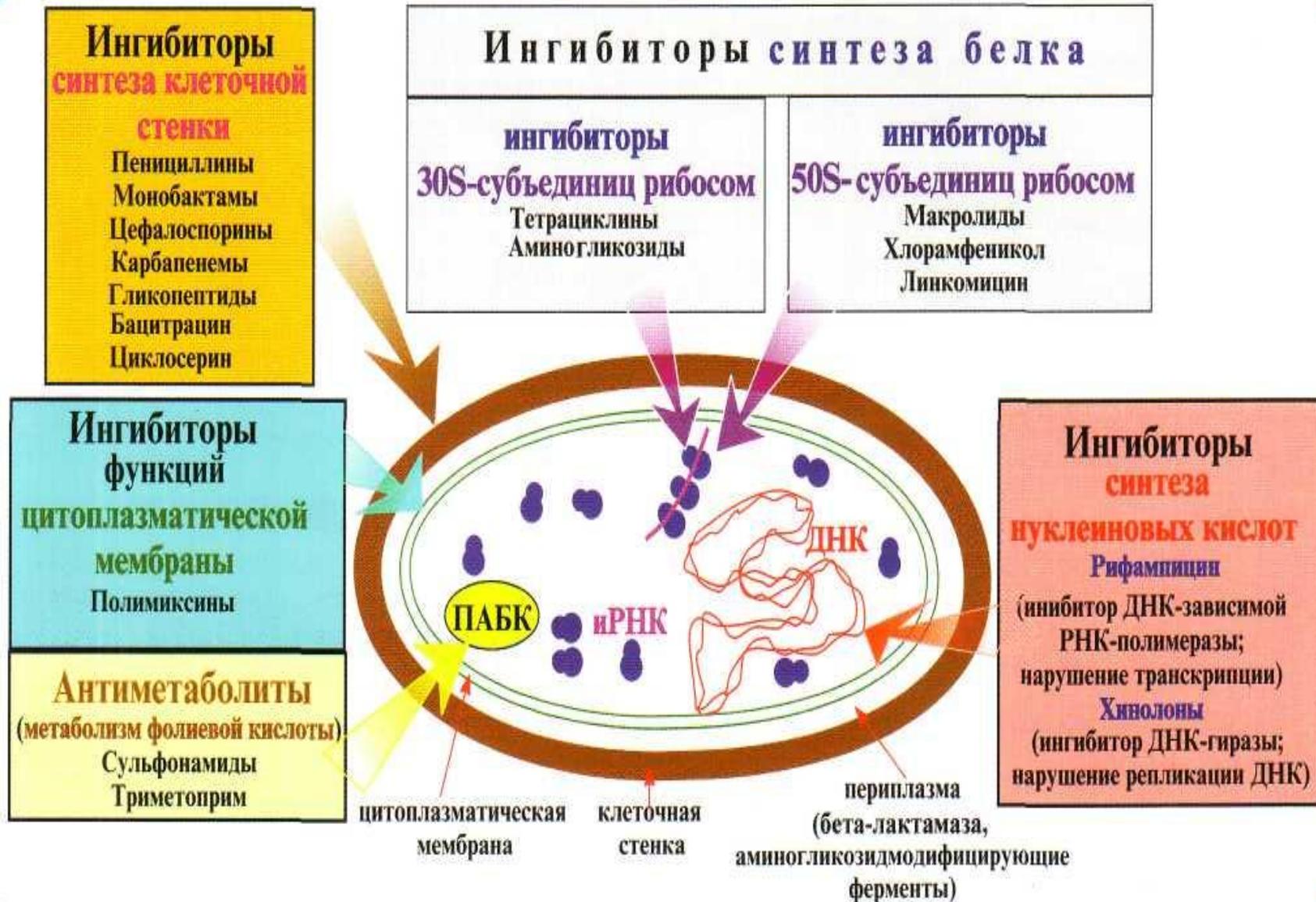
По химическому составу:

1. **Беталактамы** – азотсодержащие гетероциклические соединения с беталактамным кольцом: А-природные, Б- полусинтетические (метицилин), В-цефалоспорины
2. **Тетрациклин** и его полусинтетические производные: окситетрациклин, хлортетрациклин, морфоциклин. Состоят из 4-х конденсированных бензольных колец с разными радикалами.
3. **Аминогликозиды**, включают группы: А. Стрептомицина.
Б. Аминогликозидные, содержащие дезоксистрептамин (неомицин, мономицин, канамицин, гентамицин – олигосахаридной природы).
4. **Макролиды** – содержащие макроциклическое лактонное кольцо (эритромицин, олеандомицин).
5. **Левомецетин** – синтетическое вещество, идентичное природному хлорамфениколу с составом: нитрофенил, дихлорацетамин, пропандиол.
6. **Рифампицины**: природный – рифамицин; полусинтетический – рифампицин. Имеют макроциклическое кольцо (+ВС).
7. **Полиеновые** – нистатин, леворин, амфотерицин. С двойными связями (СН=СН).
8. **Гликопептиды** – высокомолекулярные соединения, содержащие углеводы и аминокислоты: ванкомицин, ристомицин, линкомицин.
9. производные **парааминосалициловой кислоты (ПАСК)**, изоникотиновой кислоты (изониазиды)- это противотуберкулезные препараты первого ряда.
10. **Фторхинолоны**: циклофлоксацин, нефлоксацин, офлоксацин.
11. **Фосфомицины** – из группы фосфоновой кислоты (действие на Гр –).

Классификация по механизму действия:

- ❑ -ингибиторы сборки, пространственного расположения и синтеза пептидогликана
- ❑ -ингибиторы синтеза белка
- ❑ -ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов
- ❑ -ингибиторы синтеза мембраны грибов

Механизм действия антибиотиков на бактерии



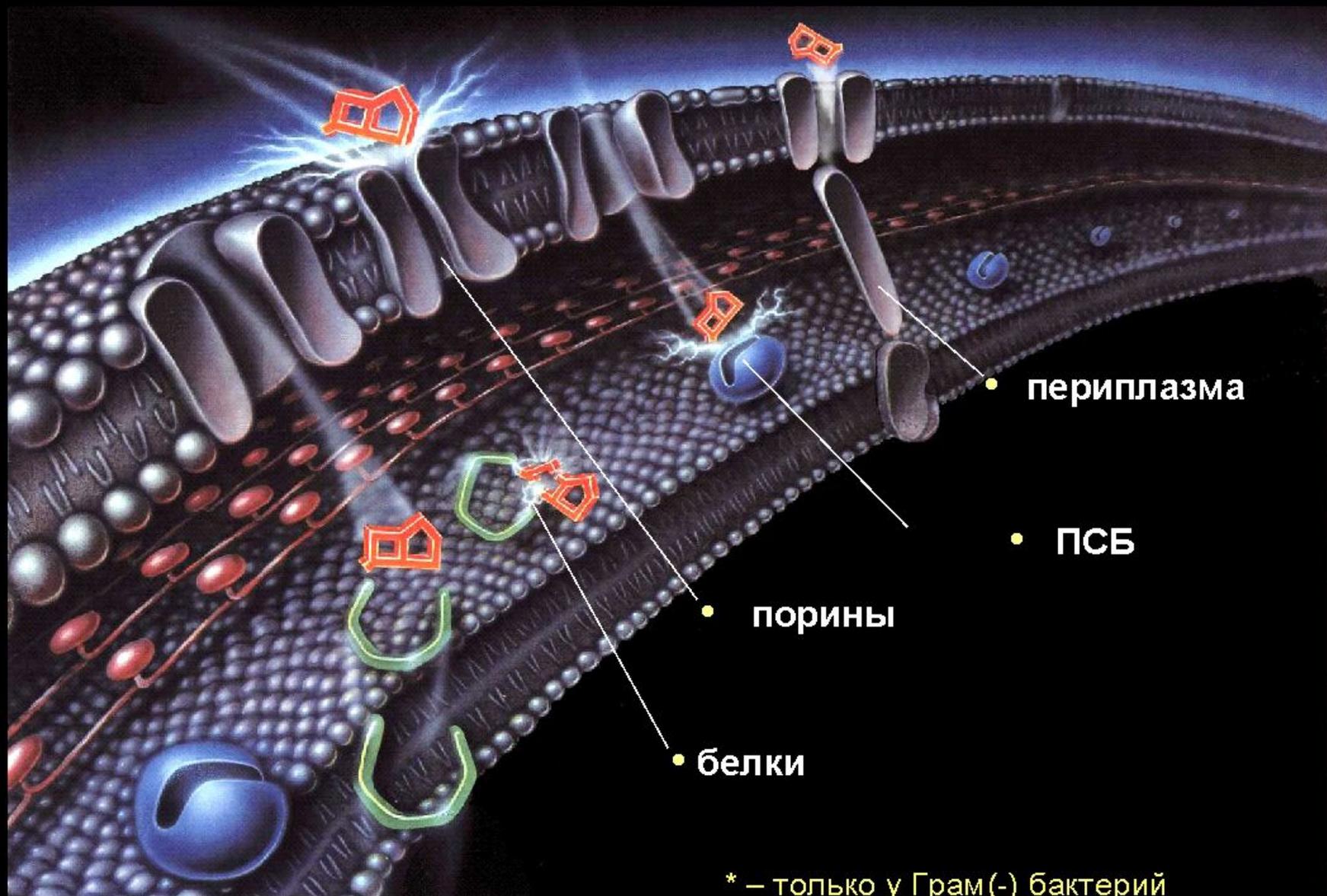
Ингибиторы синтеза пептидогликанов

- снижают активность промежуточных предшественников синтеза клеточной стенки (ванкомицин).

Ингибиторы сборки и пространственного расположения молекул пептидогликана - это бета-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины).

Мишенью являются транспептидазы.

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К β -ЛАКТАМАМ



Ингибиторы синтеза белка на уровне рибосом 70S

- Тетрациклины
- Хлорамфеникол

Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов

Механизм действия:

- Фторхинолонов - избирательно подавляют бактериальные ферменты ДНК-гиразы, участвующие в репликации ДНК.
- Рифампицины угнетают активность ДНК-зависимых РНК-полимераз, вследствие чего у бактерий подавляются процессы транскрипции.

Лекарственная устойчивость бактерий

Существуют два типа: естественная (природная) и приобретенная.

- **Естественная лекарственная устойчивость** является видовым признаком и не зависит от первичного контакта с данным антибиотиком (в ее основе нет никаких специфических механизмов).
- **Приобретенная лекарственная устойчивость** возникает только в результате изменения ее генома (хромосомный и плазмидный).

Варианты генетических изменений: I.

- Мутация в генах бактериальной хромосомы, вследствие чего продукт атакуемого гена перестает быть мишенью для данного антибиотика. Происходит изменение структуры белка, либо он становится недоступным для антибиотика.
- Устойчивость к антибиотику или сразу к нескольким благодаря приобретению дополнительных генов, носителями которых являются R-плазмиды.



NB! Приобретая устойчивость к антибиотику, бактерии получают наиболее выгодные преимущества: благодаря селективному давлению антибиотиков происходит вытеснение чувствительных к ним штаммов, а устойчивые выживают и играют главную роль в эпидемиологии данного заболевания.



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ



Разрушение молекулы антибиотика - бета-лактамазы разрушают бета-лактамное кольцо пенициллинов и цефалоспоринов

Модификация структуры молекулы антибиотика. Гены R-плазмид кодируют белки, которые вызывают модификации молекул антибиотика путем их ацетилирования, фосфорилирования или аденилирования. В результате - утрачивается их биологическая активность.

3. Изменение структуры чувствительных к действию антибиотиков мишеней. Изменение структуры белков рибосом. Изменение структуры бактериальных гираз в результате мутации приводит к формированию устойчивости к хинолонам;

4. Образование бактериями «обходного» пути метаболизма для биосинтеза белка-мишени, который оказывается нечувствительным к данному химиопрепарату - сульфаниламидные препараты.

5. Формирование механизма активного выведения из клетки антибиотика (один из вариантов устойчивости к тетрациклинам).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ



Разрушение молекулы антибиотика - бета-лактамазы разрушают бета-лактамное кольцо пенициллинов и цефалоспоринов

Модификация структуры молекулы антибиотика. Гены R-плазмид кодируют белки, которые вызывают модификации молекул антибиотика путем их ацетилирования, фосфорилирования или аденилирования. В результате - утрачивается их биологическая активность.

3. **Изменение структуры чувствительных к действию антибиотиков мишеней.** Изменение структуры белков рибосом. Изменение структуры бактериальных гираз в результате мутации приводит к формированию устойчивости к хинолонам;

4. **Образование бактериями «обходного» пути метаболизма для биосинтеза белка-мишени,** который оказывается нечувствительным к данному химиопрепарату - сульфаниламидные препараты.

5. **Формирование механизма активного выведения из клетки антибиотика** (один из вариантов устойчивости к тетрациклинам).



C. Lynn

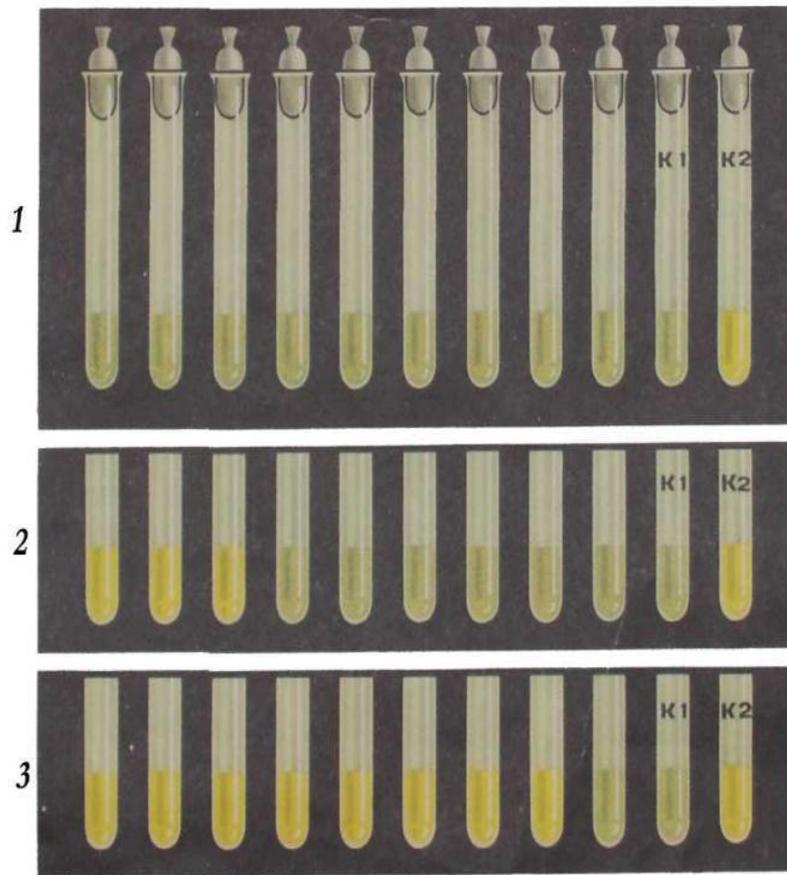
Возможности и пути образования лекарственной устойчивости у бактерий

- Устойчивость как следствие мутации не играет основную роль.
- Основная роль принадлежит генам **R-плазмид**. Генофонд лекарственной устойчивости образуется за счет генов, имеющих у продуцентов антибиотиков (гены самозащиты).
- В природе, особенно в почве, а также в кишечнике человека и животных микроорганизмы сосуществуют в тесных взаимоотношениях, что обеспечивает им постоянную возможность обмена генетическим материалом (конъюгация).

Методы оценки чувствительности к антибиотикам

- **Метод серийных разведений** применяют для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) — наименьшей концентрации антибиотика, полностью подавляющей рост исследуемых бактерий (помутнение бульона).

МЕТОД СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ



ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

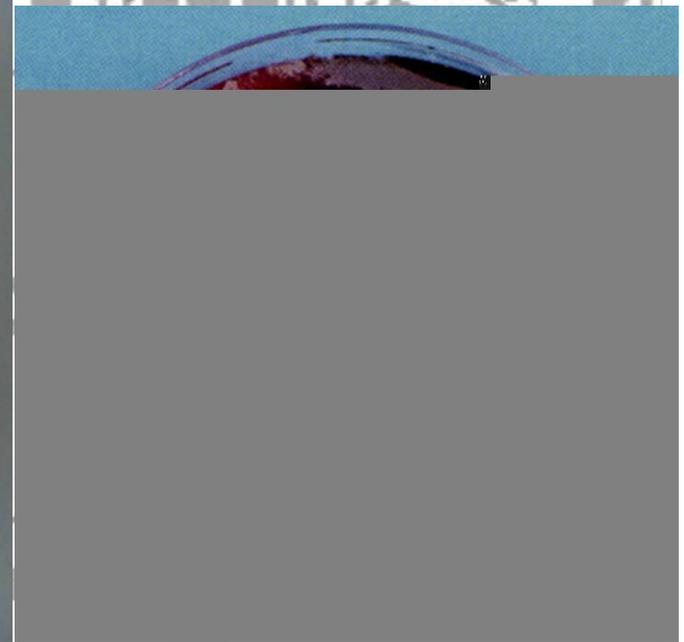
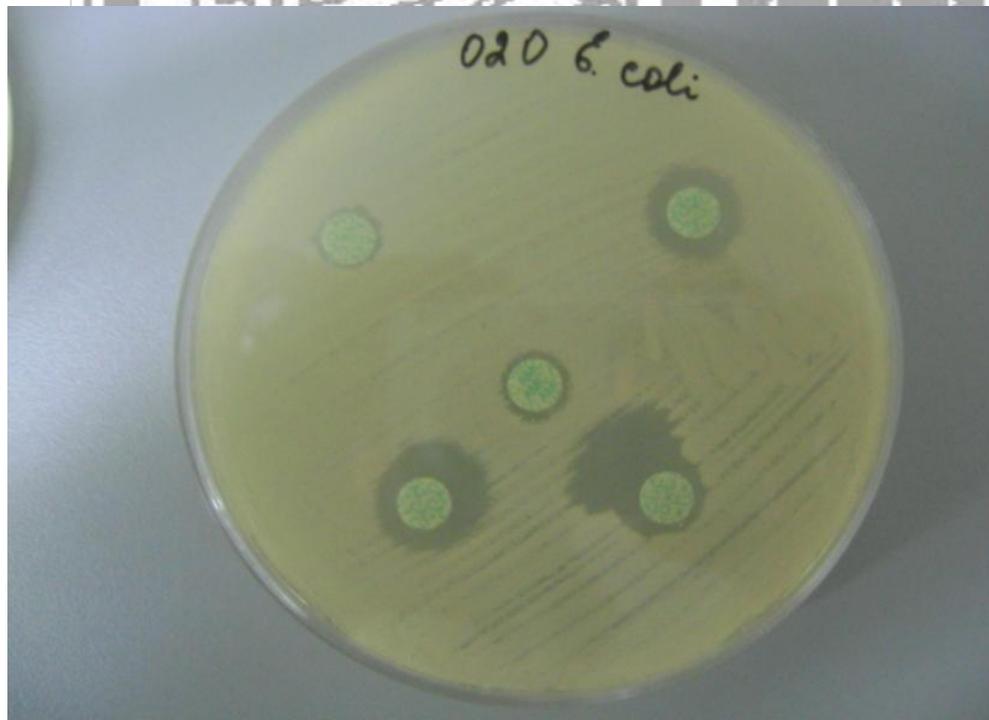
1-НЕ ЭФФЕКТИВЕН 2-МАЛО ЭФФЕКТИВЕН 3-ЭФФЕКТИВЕН
K-КОНТРОЛЬ

•Диско-диффузный метод

После посева культуры бактерий газоном, укладывается диск с антибиотиком...

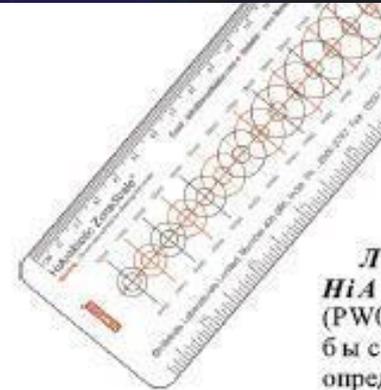
В результате диффузии антибиотика из диска рост чувствительного возбудителя подавляется (зона задержки роста).

□Метод стандартизован только для «быстрорастущих» микроорганизмов, образующих сплошной рост на плотной питательной среде (в виде «газона») через 18-20 часов инкубации.



ОСНАЩЕНИЕ МЕТОДА:

- **1. Агар Мюллера-Хинтона.** *Среда должна быть такого качества, чтобы размеры контрольных зон для референс – штаммов соответствовали требованиям МУК.*
- **2. Стандарт мутности 0,5 единиц по Мак-Фарленду.**
- **3. Стерильный физиологический раствор и культура микроорганизма.**
- **2. Стандартизированные диски пропитанные АБ.**

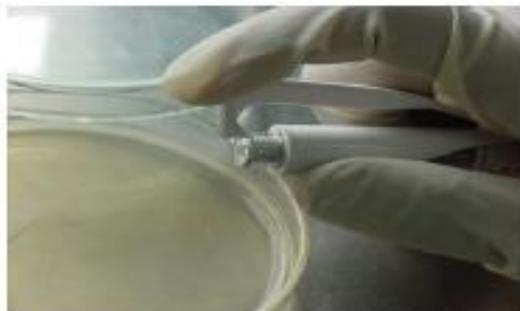


Линейка-лекало HiAntibiotic ZoneScale (PW096): применяется для быстрого и легкого определения диаметров зон задержки роста на чашках с относительно прозрачными питательными средами.

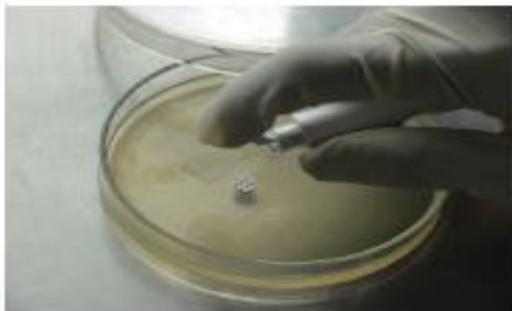


Ход исследования:

- Приготовить взвесь ЧК м/о
- Сравнить с 0,5 по Мак –Фарленду
- Чашку со средой Мюллер-Хинтона инокулировать ЧК
- Уложить диски *не более 6*
- Инкубировать в термостате 18 – 24 часа
- Прочесть и зафиксировать результат



Теперь диспенсер готов к работе



Слегка надавить на рычаг диспенсера над чашкой Петри в том месте, где Вы хотели-бы положить диск



Чашка Петри после инкубации

CNS

030

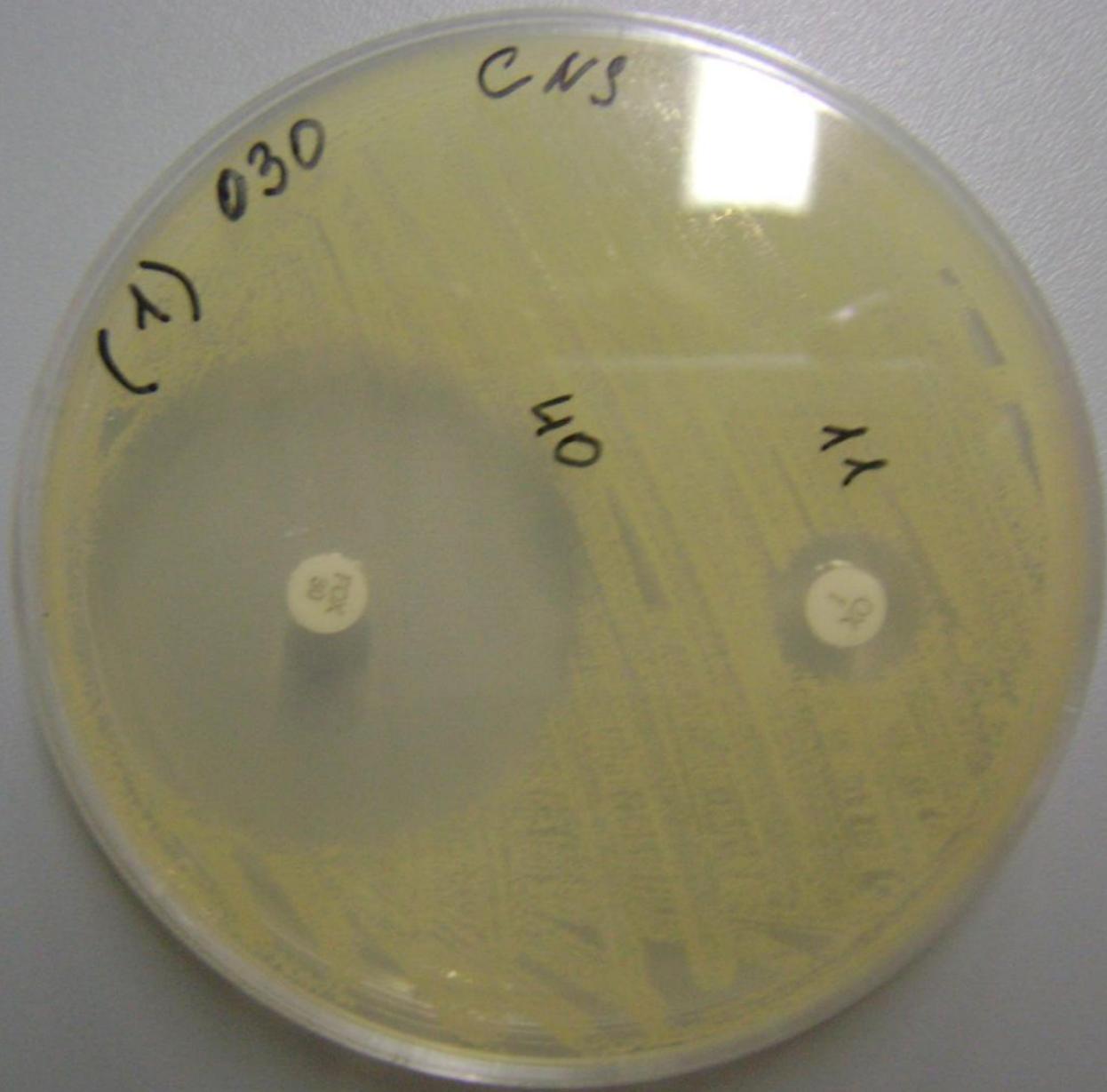
(1)

40

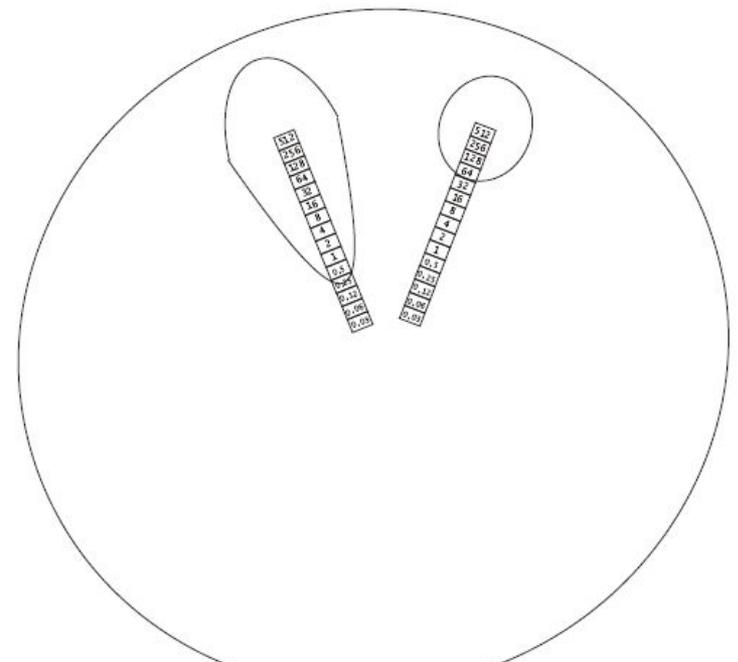
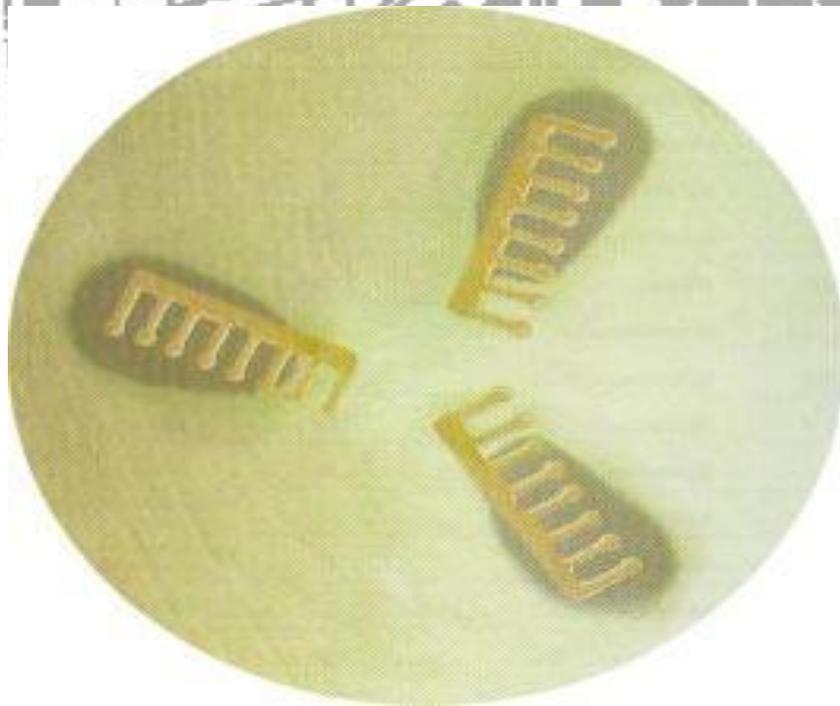
44

82

84



- **Е-тесты** это пластиковые полоски, на внутренней (обращенной к агару) стороне которых нанесен антибиотик в заданном градиенте концентрации (убывающие концентрации), а на внешней стороне – шкала соответствующих значений МПК. Посев инкубируют, результаты интерпретируют, используя стандартные критерии.



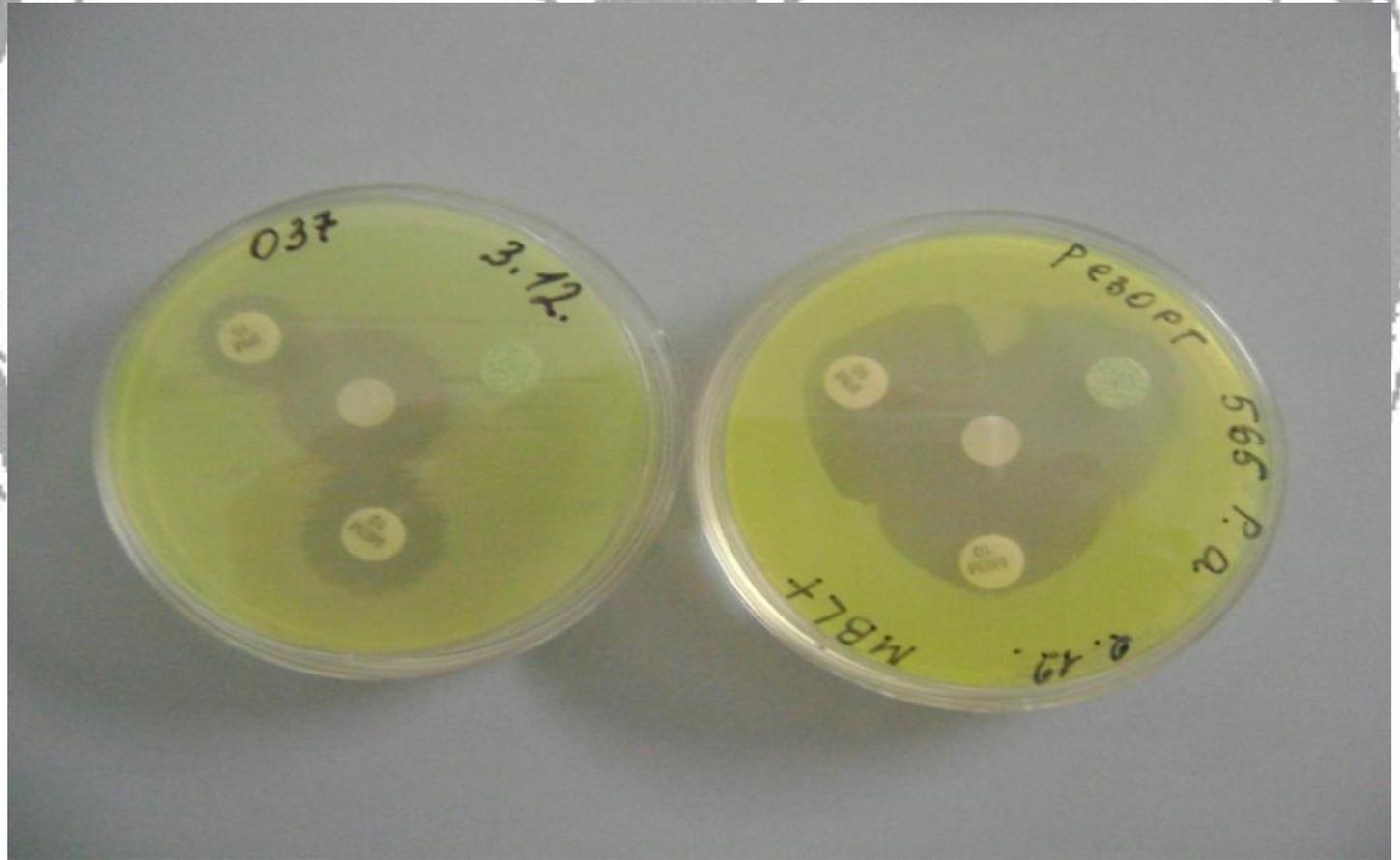
S. aureus
Эритромицин

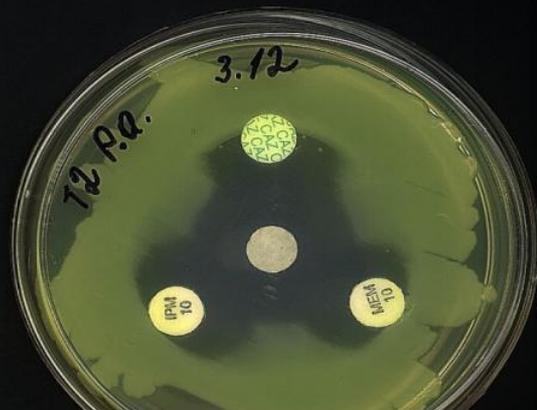
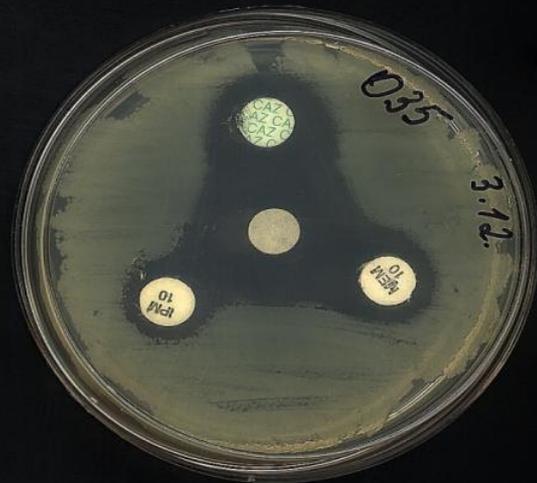
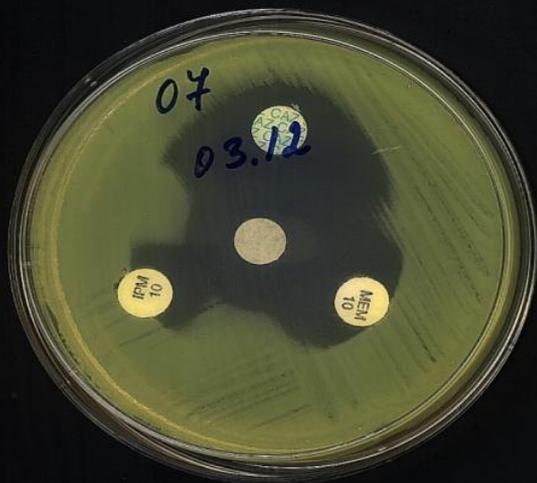


•Метод "двойных дисков"

Используются **два диска** каждого антибиотика, расположенных на разном расстоянии от диска с клавулановой кислотой.

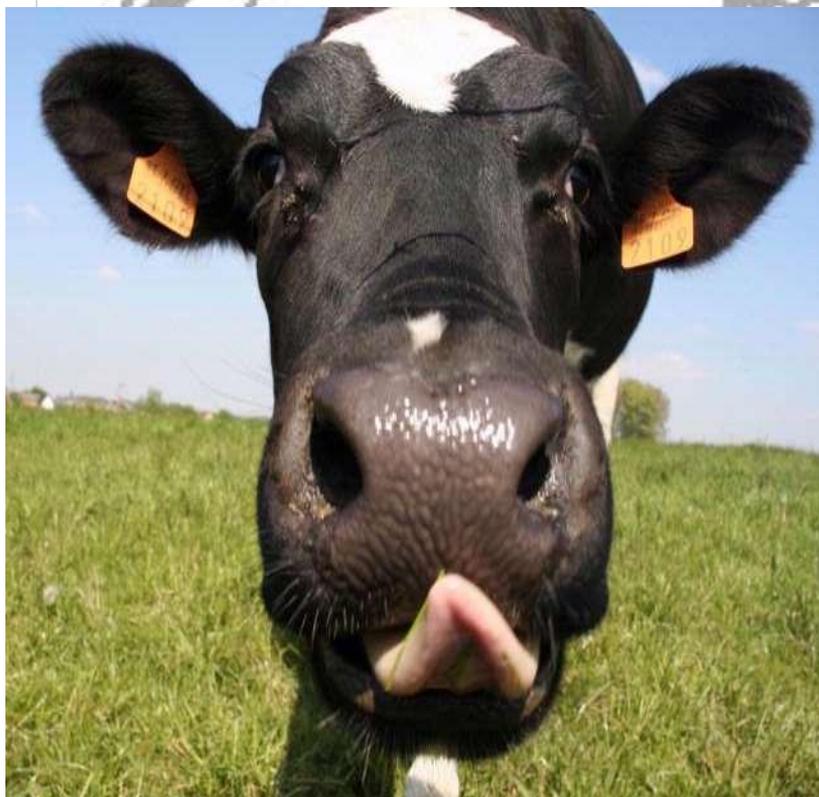
□Используется для Госпитальных штаммов





Спасибо дорогой мед -проф

ОМСК РОССИЯ



MEDICINAE