

Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям.

БиблиографияФармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. [Электронный ресурс] : учебное пособие / Орехов С.Н. ; под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970413036.html

АвторыОрехов С.Н. / Под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского

ИздательствоГЭОТАР-Медиа

Год издания2012

ПрототипЭлектронное издание на основе: Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям: учебное пособие. Орехов С.Н. / Под ред. В.А. Быкова, А.В. Катлинского. 2012. - 384 с.: ил. - ISBN 978-5-9704-1303-6.

Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ 3

ВВЕДЕНИЕ 6

РАЗДЕЛ I. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ ДНЕВНОГО И ВЕЧЕРНЕГО ОТДЕЛЕНИЙ 14

ГЛАВА 1 АНТИБИОТИКИ 14

ГЛАВА 2 АМИНОКИСЛОТЫ 65

ГЛАВА 3 ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ 74

ГЛАВА 4 СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ 86

ГЛАВА 5 ПРОБИОТИКИ 101

ГЛАВА 6 БИОПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 108

ГЛАВА 7 ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИООБЪЕКТЫ (КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ) 118

ГЛАВА 8 РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ 127

ГЛАВА 9 ВАКЦИНЫ 139

РАЗДЕЛ II ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ ЗАОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ 150

КРАТКИЙ ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ-СПРАВОЧНИК С КОММЕНТАРИЯМИ 308

ЛИТЕРАТУРА 340

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебно-методическое пособие «Руководство к практическим занятиям по фармацевтической биотехнологии» представляет собой дополнение к теоретическому курсу «Биотехнология». Цель пособия - привить будущим провизорам практические навыки, без которых невозможна деятельность по производству, отпуску и контролю таких медикаментов для лечения, профилактики и диагностики заболеваний, которые по тем или иным причинам без использования биообъектов создать невозможно.

В настоящее время фармацевтическая промышленность как в нашей стране, так и за рубежом производит с использованием биотехнологий более половины всех лекарственных средств (ЛС). В частности, таким способом работает вся антибиотическая промышленность, а также большая часть фармацевтических производств, поставляющих на рынок витамины, медиаторы, гормоны, ферментные препараты, вакцины, анатоксины, нормофлоры и специфические диагностикумы. Современная фармация просто немыслима без использования генно-инженерных биотехнологий, без культур клеток лекарственных растений, без продуцирующих моноклональные антитела гибридом. Следовательно, фармацевт, предполагающий посвятить свою сознательную практическую деятельность благородному делу лечения и профилактики болезней, должен не только ориентироваться в основах современной биотехнологии ЛС, но и владеть определенными навыками работы с биообъектами, которые в конкретных технологических системах будут служить элементной базой для создания лекарств.

При этом следует иметь в виду, что бурное развитие биотехнологии ЛС делает данное направление научно-технического прогресса одним из самых приоритетных, и те технологии, которые на сегодняшний момент доступны лишь крупным фармацевтическим производствам, завтра вполне могут стать достоянием широкой сети малых предприятий при аптеках. В свою очередь совершенно очевидно, что рост подобных производств потребует соответствующего кадрового обеспечения. Именно поэтому провизоры, владеющие навыками работы с биообъектами, способными продуцировать лекарственные субстанции или биотрансформировать в таковые полупродукты, на этих предприятиях найдут широкие возможности для применения и совершенствования знаний, приобретенных за годы обучения в

высшей школе, в том числе в курсе практических занятий по биотехнологии на кафедре общей фармацевтической и биомедицинской технологии фармацевтического факультета Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова.

Данный сборник учебно-методических материалов имеет два основных раздела. Первый из них, включающий 9 тем по частной биотехнологии ЛС, содержит подробное описание 15 практических заданий, выполняемых студентами в рамках практикума.

Все практические работы посвящены получению и контролю медицинских препаратов, промышленное производство которых основано на использовании:

- культур клеток растений (адаптагены, противоаритмические, кардиотропные средства);

• бактерий (витамины, ферменты, пребиотики, эубиотики, антибиотики);

• грибов (гормоны, антибиотики);

• химерных клеток генно-инженерных продуцентов (аминокислоты, инсулин, интерфероны, моноклональные антитела);

• культур клеток эмбрионов японских перепелов - культура клеток Vero (противокоревая вакцина).

За некоторыми исключениями [пособие по получению рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)] все учебнометодические разработки (будь то пособие по скринингу антибиотиков или пособие по получению убихинонов и т.д.) построены по единому логическому плану:

• первая часть содержит сведения о вариантах применения того или иного ЛС при лечении или диагностике в клинической практике;

• вторая часть кратко описывает природу биообъекта, используемого при создании этого средства;

• в третьей части приведены данные о биотехнологической системе, в которой данный биообъект функционирует;

• финальная часть включает информацию о контроле качества медикамента, изготовленного биотехнологическим способом.

В итоге студент, выполнивший все практические задания, приобретает навык работы с перевиваемыми культурами клеток экзотических растений (женьшень), с микробами-продуцентами нормофлоров (колибактерин*, лактобактерин*), витаминов (аскорбиновая кислота, цианокобаламинр), с грибами и актиномицетами - продуцентами антибиотиков, с химерными клетками-продуцентами

треонина. Одновременно он знакомится и частично осваивает как традиционные методы культивирования биообъектов (каллусное культивирование), так и более сложные приемы управляемого культивирования, основанный на использовании ферментеров с компьютерным программным обеспечением. Также студент получает представление о работе генных инженеров, занятых как в области фундаментальных исследований по биотехнологии (создание рекомбинантных штаммов-продуцентов видоспецифических белков человека), так и в производственной практике (генно-инженерный инсулин).

По ходу выполнения заданий практикума проводится подробное ознакомление с реагентами и оборудованием биотехнологического производства, а также осваиваются те современные методы контроля (идентифицирующий электрофоретический анализ, высокоскоростная и тонкослойная хроматография и т.п.), без которых невозможно биотехнологическое получение генно-инженерных инсулина и интерферонов, панаксазидов домаранового ряда, витамина С♠, кортизона, полусинтетических пенициллинов, современных вакцин и т.п.

Освоив все эти методики, студент получает возможность самостоятельно использовать свои знания, например оценить соответствие поступившей в аптеку вакцины и прилагаемого сертификата качества или в условиях контрольно-аналитической лаборатории фармпредприятия под руководством опытного биотехнолога провести микроскопическое исследование посевного материала и т.д.

Весь лабораторный практикум рассчитан на 50 ч интенсивных занятий. Перед выполнением лабораторных работ и по их завершении студенты подвергаются контрольному опросу. Примерный перечень контрольных вопросов по каждой теме приведен в конце каждого практического занятия, а суммарный перечень контрольных вопросов по курсу биотехнологии ЛС - в конце настоящего учебнометодического пособия. В процессе практических занятий студенты имеют возможность получить у преподавателя исчерпывающие консультации об особенностях выполнения лабораторных работ.

Во втором разделе представлена полная информационная картина о содержании курса «Биомедицинские технологии», что является необходимым условием для последовательного и эффективного усвоения материала студентами заочного отделения. Данный раздел - оптимизированный и дополненный вариант учебнометодического пособия «Биотехнология» для студентов заочного

отделения. Существенно переработаны и расширены включенные в процесс обучения контрольные работы ? 1 и 2, а также итоговый тестовый контроль. Отдельным, совершенно новым, звеном представлены ситуационные задачи с ответами, которые служат необходимой базой для успешного экзаменационного собеседования с преподавателем.

На основе предыдущего опыта и с учетом возникающих в процессе усвоения материала трудностей в конце пособия представлен словарь-справочник наиболее значимых применяемых в биотехнологии терминов с подробными комментариями.

ВВЕДЕНИЕ

Многие ЛС - биопрепараты. Это означает, что их получают из живых источников, к примеру из клеток. Биопрепараты представляют собой сложные смеси, молекулы активных компонентов (как правило, белков) которых в сотни раз крупнее молекул большинства традиционных препаратов. Обычно такие препараты эффективны исключительно при внутривенном введении. К биопрепаратам относят кровь и ее компоненты, вакцины, а также получаемые с помощью биотехнологических методов рекомбинантные белки и моноклональные антитела. В конце 1990-х гг. биотехнология ассоциировалась преимущественно с рекомбинантными биопрепаратами и антителами, однако биотехнологические компании все чаще обращаются к открытиям в области генетики и других областей биологии для разработки так называемых малых молекул. В настоящее время на стадии клинических испытаний находится около 300 биотехнологических лекарственных препаратов и вакцин для лечения и предотвращения более чем 200 заболеваний, в том числе различных форм рака, болезни Альцгеймера, заболеваний сердца, диабета, рассеянного склероза, СПИДа и артрита. С помощью биотехнологии были разработаны сотни диагностических тестов, позволяющих избежать заражения СПИДом и другими инфекционными заболеваниями при переливании донорской крови, а также диагностировать многие болезни на ранних стадиях, что необходимо для их успешного лечения. Известные тесты на беременность также являются биотехнологическими продуктами. Последние годы ознаменовались феноменальным ростом продаж лекарственных препаратов, разработанных с использованием технологий генной инженерии. По итогам 2007 г. общемировой объем продаж фармацевтических препаратов увеличился на 9%, при этом продажи биотехнологических препаратов выросли на 18,7%. Такие цифры обусловлены прежде всего особенностями генно-инженерных препаратов, которыми они выгодно отличаются от традиционных фармацевтических препаратов. Дело в том, что регуляция многих важнейших биологических процессов в организме человека происходит при участии различных белковых молекул, имеющих довольно сложную структуру. Малейшие изменения в строении таких молекул приводят к полной или частичной потере ими своих свойств. До зарождения биотехнологии как науки синтезировать подобную молекулу не представлялось возможным, поэтомуфармацевтические компании были заняты поиском и исследованием различных субстанций с простой химической формулой, обладающих необходимыми фармакологическими свойствами. Подобный подход обладает одним важным преимуществом: организовать промышленное производство таких препаратов не составляет большого труда, а себестоимость их производства невысока. Однако помимо преимуществ существуют и серьезные недостатки: эти препараты заметно уступают своим биотехнологическим аналогам по показателям эффективности и/или переносимости.

Технологии генной инженерии позволили выделить из ДНК человека ген, отвечающий за синтез того или иного белка, встроить его в ДНК бактерии и соответственно запрограммировать ее на производство необходимого белка, обладающего точно заданными свойствами. Эти методы гораздо более прогрессивны по сравнению с

существующей по сей день практикой поиска во внешней среде субстанций, имеющих простое химическое строение и обладающих сходным действием. Таким способом американская компания Genentech впервые синтезировала человеческий инсулин, до появления которого больные сахарным диабетом были вынуждены, несмотря на выраженные побочные эффекты, принимать инсулин, выделенный из поджелудочных желез свиней и крупного рогатого скота. Это произошло в 1978 г., и этот год считают официальной датой рождения биотехнологии. Технологии генной инженерии позволяют синтезировать лекарственные препараты с заранее известными свойствами в отличие от традиционной фармацевтики, которая для разработки новых препаратов вынуждена исследовать свойства десятков тысяч образцов различных химических субстанций. Благодаря новым подходам к разработке лекарственных препаратов в последние годы произошли революционные прорывы в лечении таких заболеваний, как рак, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет и др. В результате компании, среди которых Genentech, Amgen, Biogen, Amylin, за короткий срок из небольших малоизвестных предприятий превратились в лидеров мирового фармацевтического рынка. Напротив, такие типичные представители фармацевтического сектора, как Pfizer, Merck, Bristol-Myers Squibb, оказались в затруднительном положении из-за проблем с новыми перспективными разработками и скандалов, связанных с побочными свойствами медицинских препаратов, уже присутствующих на рынке. Наиболее наглядно особенности подходов к разработке и

производству новых лекарственных препаратов у фармацевтических и биотехнологических компаний демонстрируют противораковые препараты, разработанные в последние годы. Как известно, одна из отличительных особенностей раковых клеток - высокая скорость деления. До начала применения биотехнологий для синтеза новых противораковых препаратов усилия фармацевтических компаний были направлены на поиски субстанций, способных избирательно поражать клетки с высокой скоростью деления. Такие препараты были найдены, и их применяют по сей день с неплохими результатами, но поскольку высокой скоростью размножения отличаются не только раковые, но и многие нормальные клетки организма, то серьезные побочные эффекты на фоне приема данных лекарств стали обычным явлением. Более избирательного воздействия добиться, к сожалению, не удалось. Внедрение биотехнологий в корне изменило ситуацию. Во-первых, были открыты особые рецепторы на поверхности раковых клеток, которые отсутствовали в здоровых клетках организма; во-вторых, методами генной инженерии удалось синтезировать белки, способные связываться с этими рецепторами и вызывать гибель раковых клеток. Таким образом, получены препараты, способные избирательно поражать раковые клетки, а здоровые клетки организма оставлять нетронутыми. Это позволило не только существенно улучшить результаты лечения онкологических больных, но и исключить возможность возникновения тяжелых побочных эффектов, связанных с приемом препаратов старого поколения. То есть преимущества и отличные перспективы генно-инженерных препаратов становятся очевидными, несмотря на некоторые присущие им недостатки (такие, как высокая себестоимость производства и соответственно высокая стоимость лечения). Другой недостаток - невозможность приема внутрь препаратов, разработанных с

применением генной инженерии, так как по своей природе они являются белками и разрушаются в желудочно-кишечном тракте. Такие препараты можно применять только в инъекциях. Несмотря на перечисленные недостатки, будущее фармацевтического рынка за биотехнологическими препаратами. Косвенно это утверждение укрепляет и увеличившаяся активность крупнейших фармацевтических компаний в сфере биотехнологий. Не обладая перспективными технологиями, лидеры фармацевтического производства стремятся к партнерству с биотехнологическими компаниями для совместной разработки новых препаратов. Сотрудничество в таких случаяхвзаимовыгодно, так как биотехнологические компании получают доступ к отлаженной системе клинических испытаний и мощной дистрибьюторской сети, которыми обладают крупные фармацевтические компании. Сравнивая перспективы биотехнологических и фармацевтических компаний, нельзя не упомянуть об одном очень важном обстоятельстве: любой запатентованный лекарственный препарат рано или поздно теряет свою патентную защиту, и производители более дешевых дженериков получают право на производство и продажу генерических версий препарата, не вкладывая средств в его клинические испытания. Как результат - после истечения срока патентной защиты объем продаж патентованных препаратов снижается в среднем на 80%. Это обстоятельство является серьезной проблемой для крупнейших фармацевтических компаний, так как требования регулирующих органов к безопасности и эффективности новых ЛС постоянно увеличиваются, а вместе с ними растут и расходы на их разработку. Что касается генно-инженерных препаратов, то технология их разработки и производства настолько сложна, что свойства конечного продукта напрямую зависят от метода его получения. В связи с этим производители дженериков пока не получили разрешения на выпуск генерических версий генно-инженерных препаратов без проведения дополнительных и дорогостоящих клинических испытаний, которые большинству из этих компаний просто не под силу. Говоря о сотрудничестве биотехнологических и фармацевтических компаний, нельзя не обратить внимание на еще одно очень важное обстоятельство. В современных условиях наблюдают тесное переплетение биотехнологии и биоорганической химии, и хотя в ряде случаев приоритет отдают либо органическому синтезу, либо биосинтезу, вместе с тем существует множество примеров получения ЛС путем успешного сочетания органического синтеза и биосинтеза. Так, технология промышленного производства аскорбиновой кислоты, состоящая из многоэтапного органического синтеза, включает и этап биосинтеза (трансформация d-сорбита в L-сорбозу), который осуществляется с участием уксуснокислых бактерий. Сочетание биосинтеза, органического синтеза и биотрансформации также можно проследить на примере получения полусинтетических антибиотиков из бензилпенициллина*.Как известно, само понятие «биотехнология» - это собрание технологий, использующих свойства клеток, например их способность синтезировать различные вещества, и заставляющих биологические

молекулы, такие как ДНК и белки, работать на достижение заданных целей, в частности для получения фармацевтических субстанций. Какие же конкретно технологии используют биотехнологи в настоящее время? Традиционной и одновременно самой старой методикой, применяемой в биотехнологии для производства лекарственных

препаратов, является ферментация, при которой используют живые клетки или их молекулярные компоненты. В качестве живых клеток, как правило, используют одноклеточные микроорганизмы, такие как дрожжи или бактерии; из молекулярных компонентов чаще всего находят применение различные ферменты. Одна из разновидностей ферментации - микробное брожение, которое неосознанно использовалось человеком в течение не одной тысячи лет для производства пива, вина, дрожжевого хлеба, квашеных овощей и консервированных продуктов. В настоящее время активно применяют довольно широкий спектр возможностей природных микроорганизмов, которые обеспечивают производство таких необходимых ЛС, как антибиотики, противозачаточные средства, аминокислоты, витамины и т.д. Микробную ферментацию в комбинации с методом рекомбинантных ДНК также применяют при промышленном получении ЛС биологического происхождения, например человеческого инсулина, вакцины против гепатита В и т.д. Большинство белков не может быть синтезировано химическими методами, поэтому для их производства в фармакологических целях существует довольно ограниченное количество средств: использование микроорганизмов, культур клеток растений и млекопитающих. При этом затраты на строительство предприятия, оборудованного всем необходимым для промышленного производства лекарственных препаратов в культурах клеток, составляют более 500 млн долларов, а срок выхода завода на полную эксплутационную мощность колеблется в интервалах от 2 до 5 лет. Культуры растительных клеток являются важным источником природных ЛС (к примеру, на основе паклитакселя, который содержится в тисовой древесине, фармацевтическая промышленность производит химиотерапевтический препарат таксол*), а также используются при создании трансгенных растений. В число терапевтических белков, синтезируемых трансгенными растениями, входят антитела, антигены, факторы роста, гормоны, ферменты, белки крови и коллаген. Кроме того, немалый прогресс достигнут в использовании растений в качестве систем, производящих и доставляющих вакцины в организм. Так, противоопухолевая «вакцина»,

использующаяся для лечения (а не предотвращения, в отличие от традиционных вакцин) неходжкинской лимфомы, также синтезируется растениями. Растения как источники фармакологических препаратов не требуют дорогостоящего специализированного оборудования и обходятся гораздо дешевле. Кроме того, масштабы их применения можно относительно легко регулировать в соответствии с меняющимися запросами рынка. Использование растений в качестве производителей терапевтических белков позволяет исследователям разрабатывать новые усложненные молекулярные формы, которые не могут синтезироваться культурами клеток млекопитающих. Клетки насекомых, так же как и растительные клетки, применяют для синтеза лекарственных препаратов. Кроме того, крайне перспективным направлением является использование этих клеток для производства так называемых VLP-вакцин (VLP - вирусоподобные частицы) для лечения инфекционных заболеваний (например, атипичной пневмонии и гриппа). Клетки млекопитающих используют для синтеза лекарственных веществ, в частности некоторых животных белков, по строению слишком сложных для того, чтобы синтезировать их с помощью генетически модифицированных микроорганизмов. К примеру,

моноклональные антитела синтезируются именно культурами клеток млекопитающих, их с успехом применяют при производстве вакцин. Клетки млекопитающих также служат прекрасным дополнением при тестировании безопасности и эффективности новых лекарственных препаратов на животных. В настоящее время методы терапии, основанные на использовании культур взрослых стволовых клеток, обнаруженных в некоторых тканях организма (в костном мозге, жировой ткани, мозге и др.), занимают достойное место в клинической практике. Например, взрослые гемопоэтические стволовые клетки уже давно применяют в качестве трансплантатов костного мозга. Они необходимы для восстановления процессов созревания и формирования всех типов клеток крови. В качестве одного из методов терапии довольно большого числа заболеваний можно использовать эмбриональные стволовые клетки. Их получают из эмбрионов, которые развиваются из яйцеклеток, переданных исследователям в научных целях и оплодотворенных *in vitro* (в клиниках, занимающихся экстракорпоральным оплодотворением) с согласия доноров. Обычно в исследованиях участвуют бластоцисты - 4-5-дневные эмбрионы (под микроскопом выглядят как состоящие из нескольких сотен клеток шарики). Для выделения человеческих эмбриональных стволовыхклеток внутренняя клеточная масса (бластоцисты) переносится в богатую питательными веществами культуральную среду, где клетки начинают активно делиться. В течение нескольких дней клетки покрывают всю поверхность культуральной плашки. Затем клеточную культуру делят на части и помещают в новые плашки. Процесс перемещения клеток может многократно повторяться в течение многих месяцев. Максимального эффекта терапии с использованием стволовых клеток можно достичь в том случае, если стволовые клетки и ткани, выращенные из них, являются генетически идентичными клеткам реципиента. Именно поэтому, если сам пациент не является источником стволовых клеток, они должны быть модифицированы методом замещения их генетического материала генами реципиента и только потом дифференцированы в клетки специфического типа.

Современные методики использования рекомбинантных ДНК считают определяющими в биотехнологии. Сочетание технологии рекомбинантных ДНК с методом молекулярного клонирования применяют в производстве новых лекарственных препаратов и безопасных вакцин, а также при лечении некоторых генетических заболеваний для контроля над вирусными заболеваниями с целью снижения воспалительных реакций. Технология клонирования позволяет получать популяцию генетически идентичных молекул, клеток, растений или животных. Область применения клонирования чрезвычайно широка. Молекулярное (генетическое) клонирование (процесс создания генетически идентичных молекул ДНК) является фундаментальным методом биотехнологических исследований и основой развития и коммерциализации биотехнологии. Подавляющее большинство практических приложений биотехнологии, начиная с разработки лекарственных препаратов и заканчивая созданием трансгенных культур, основывается на генетическом клонировании. Метод рекомбинантных ДНК совместно с клонированием животных - превосходные животные модели для изучения различных заболеваний человека, процессов старения и формирования злокачественных новообразований. Уже сейчас эти приемы в некоторых случаях применимы для разработки новых ЛС и оценки

эффективности таких методов лечения, как генная и клеточная терапия. Клонирование животных также предоставляет возможность спасения видов, находящихся под угрозой вымирания. Интересным представляется тот факт, что создание овцы Долли признано научным прорывом не потому, что она была клоном, а потому, что в качестве генетическо-

го материала была использована клетка взрослого организма, а не эмбриональная клетка. Существует два различных способа создания идентичных генетических копий животных, один из которых - искусственное разделение эмбриона - считают устаревшим способом клонирования и на настоящий момент его практически не используют. Данный метод как бы повторяет в лабораторных условиях естественный процесс образования идентичных однояйцовых близнецов в материнской матке, т.е. сначала производится физическое разделение эмбриона на отдельные клетки, после чего каждая из них начинает развиваться отдельно. Образующиеся в результате эмбрионы внедряются в матку суррогатной матери, которая обеспечивает их вынашивание и рождение. Поскольку эмбрионы происходят из одной зиготы (оплодотворенной яйцеклетки), они генетически абсолютно идентичны. Другой метод - перенос ядра соматической клетки - начинается с выделения из организма соматической клетки (любой, кроме половых клеток: сперматозоидов и яйцеклеток). Известно, что у млекопитающих соматическая клетка содержит полный, двойной набор хромосом (в каждой паре одна хромосома получена от материнской яйцеклетки, вторая - от отцовского сперматозоида). Геном же любой половой клетки состоит только из одного хромосомного набора. В эксперименте по созданию овцы Долли ядро соматической клетки, полученной от взрослой овцы, было перемещено в яйцеклетку, ядро которой было предварительно удалено. После проведения определенных химических манипуляций яйцеклетка с замененным ядром стала вести себя как оплодотворенная яйцеклетка. В результате ее деления сформировался эмбрион, который затем был имплантирован суррогатной матери и выношен в течение полного срока беременности.

В человеческом организме синтезируется целый набор небольших белков, получивших название факторов роста. Эти белки стимулируют рост и деление клеток, а также в некоторых случаях управляют их дифференцировкой. Эти естественные белки, управляющие регенерацией тканей, используют при лечении ран, восстановлении поврежденной ткани, а также в тканевой инженерии. Белковая природа этих веществ дает возможность их крупномасштабного производства с помощью трансгенных микроорганизмов, растений или животных. К наиболее важным факторам роста относят: факторы роста эпидермиса, которые стимулируют деление клеток кожи и используются для ускорения заживления ран; эритропоэтин, спо-

собствующий продукции эритроцитов (один из первых биотехнологических продуктов); фактор роста фибробластов, стимулирующий рост клеток и применяемый при лечении ожогов и язв, а также для стимуляции роста новых кровеносных сосудов у пациентов с блокадой коронарных артерий; фактор роста нервов, способствующий росту нервных клеток и являющийся терапевтическим агентом для лечения пациентов с повреждениями головного и спинного мозга, а также дегенеративными заболеваниями

нервной системы, например болезнью Альцгеймера. Для улучшения свойств существующих белков (ферментов, антител, клеточных рецепторов) и создания новых, не существующих в природе протеинов, часто в сочетании с методом рекомбинантных ДНК применяют технологию белковой инженерии. В результате использования этой технологии были синтезированы белки, способные связываться с вирусами и мутантными генами, вызывающими опухоли, и обезвреживать их; созданы высокоэффективные вакцины; проводится активное изучение белков-рецепторов клеточной поверхности, которые часто являются мишенями для фармацевтических препаратов. Еще одна область применения белковой инженерии - создание белков, способных нейтрализовать вещества и микроорганизмы, которые могут применять для химических и биологических атак. Например, ферменты гидролазы способны обезвреживать как нервно-паралитические газы, так и используемые в сельском хозяйстве пестициды. Для создания в лабораторных условиях полусинтетических тканей и органов в настоящее время применяют тканевую инженерию. Такие ткани состоят из биосовместимого каркаса, который в организме постепенно разлагается и адсорбируется, и живых клеток, выращенных с помощью методов культивирования клеточных культур. В упрощенных методах тканевой инженерии для изготовления каркасов используют такие биологические материалы, как коллаген. Например, при изготовлении двухслойного кожного трансплантата коллагеновый гель инфильтрируют клетками соединительной ткани, после чего создают защитный поверхностный слой, состоящий из более устойчивых к внешним воздействиям клеток. Другие методы заключаются в образовании жесткого каркаса из синтетического полимера, придании ему необходимой формы и последующей имплантации. Распространен также синтез полимеров из натуральных соединений. Такие полимеры обеспечивают создание более гибких каркасов, подходящих для создания кровеносных сосудов и полых органов. После имплантации такого каркаса ворганизм происходит его заселение клетками окружающих тканей. Первыми в лабораторных условиях были созданы простые ткани (кожа и хрящ). Относительно недавно была создана биогибридная почка, которая способна поддержать жизнедеятельность пациента, страдающего острой почечной недостаточностью, в течение времени, требующегося для восстановления пораженной почки. Гибридная почка состоит из полых трубочек, засеваемых почечными стволовыми клетками, которые пролиферируют до тех пор, пока полностью не покроют внутреннюю поверхность трубочек. Впоследствии эти клетки дифференцируются в клетки почек, способные синтезировать ряд гормонов и участвующие в фильтрации крови. Кроме выполнения непосредственных метаболических функций почки, гибридная почка способна адекватно реагировать на сигналы, посылаемые другими органами и тканями организма.

Принципиально новым уровнем исследований, позволяющих проводить одновременное тестирование многих тысяч биологических образцов, стала технология микрочипов. Микрочипы необходимы для практического использования информации, полученной в результате секвенирования геномов человека и других живых организмов. Как известно, недостаточно установить последовательность генов и создать на их основе геномные карты, самое главное - определить функции входящих в их состав генов, и без белковых микрочипов эта работа настолько же трудоемка, какой была расшифровка геномов до

появления современных секвенаторов. Существует несколько разновидностей микрочипов. Например, ДНК-микрочипы используют для идентификации мутаций в генах, связанных с различными заболеваниями, для диагностики инфекционных заболеваний и определения наиболее эффективного метода антибиотикотерапии, а также скрининга микроорганизмов (как патогенных, так и полезных). Белковые микрочипы применяют как для обнаружения биомаркеров, характерных для широкого круга заболеваний, так и для идентификации различных стадий этих заболеваний, для оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях, оценки различий в экспрессии белков с целью выявления мишеней для новых лекарственных препаратов. Переход от ДНК к белковым микрочипам - существенный шаг вперед, однако здесь возникает ряд проблем. Во-первых, структура и функции белковых молекул намного сложнее, чем у молекул ДНК. Каждый тип клеток содержит тысячи различных белков, некоторые из них обладают уникальными,

характерными только для определенного типа клеток функциями. Кроме того, белки менее стабильны. Во-вторых, белковый состав клетки меняется в зависимости от состояния здоровья, возраста и влияния окружающей среды. Клеточные микрочипы способствуют в какой-то степени решению проблемы нестабильности белков в белковых микрочипах и более точному анализу взаимодействий белков внутри клетки. Тканевые микрочипы, позволяющие проводить анализ тысяч образцов тканей на одном предметном стекле, используют для определения содержания белков в здоровых и патологически измененных тканях и оценки потенциальных мишеней для лекарственных препаратов.

В настоящее время для увеличения скорости и точности диагностики заболеваний, доставки функциональных молекул в клеткимишени, повышения специфичности и скорости доставки лекарств успешно применяют нанобиотехнологии. Слово «нанотехнология» происходит от единицы измерения «нанометр», составляющей одну тысячную микрометра (микрона), что соответствует примерно размеру молекулы. Нанотехнология - изучение, производство и манипуляции над сверхмалыми структурами и приспособлениями, состоящими из одной молекулы. Возникновение нанотехнологии стало реальностью благодаря созданию микроскопических приборов, обеспечивающих возможность визуализации отдельных молекул, манипулирования ими и измерения возникающих между ними электромагнитных взаимодействий. Нанобиотехнологии объединяют в себе достижения нанотехнологий и молекулярной биологии. Они используют способность биомолекул к самосборке в наноструктуры. Так, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. Вместе с тем ДНК применяют не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наномеханизмов.

РАЗДЕЛ I. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ ДНЕВНОГО И ВЕЧЕРНЕГО ОТДЕЛЕНИЙ

ГЛАВА 1 АНТИБИОТИКИ

Тема «Антибиотики» посвящена методам выделения из почвы микроорганизмов, их идентификации по культуральноморфологическим признакам и методам хранения микроорганизмов. Даны понятия об основных продуцентах биологически активных веществ (БАВ) и их морфологических характеристиках при поверхностном и глубинном культивировании. Представлены микробиологические методы определения чувствительности и концентрации антибиотиков, которые используют как для изучения активности антибиотиков в жидкостях и тканях, так и для определения концентрации антибиотиков при сертификации готовых лекарственных форм, а также в случаях подбора терапевтической дозы антибиотиков, применяемых при лечении различных инфекционных заболеваний. Вместе с тем значительное место отведено изучению методов идентификации микроорганизмов-продуцентов с анализом макро- и микроморфологических характеристик в различные фазы роста культуры и выбором оптимальных параметров биосинтеза. Рассмотрены методы качественного и количественного определения антибиотиков в культуральной жидкости.

Цели изучения темы:

• выработать у студентов умение обоснованно выбирать и практически применять методы выделения микроорганизмов из почвы и проведения скрининга БАВ на основе макро- и микроморфологических характеристик основных групп микроорганизмов и условий их хранения (на примере продуцентов антибиотиков);

• научить применению на практике методов определения чувствительности и концентрации антибиотиков, а также их качественного и количественного определения;

• на основе теоретических знаний о методах идентификации микроорганизмов-продуцентов БАВ, процессах развития микроорганизмов при росте на плотной питательной среде и при глубинном культивировании, оптимизации параметров биосинтеза БАВ выработать у студентов умение практически применять эти методы для решения конкретных биотехнологических задач.

Данная тема представлена четырьмя семинарскими занятиями, каждое из которых включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ и контрольные вопросы.

В рамках первого практического занятия проводятся две лабораторные работы: «Поиск и характеристика микроорганизмовпродуцентов антибиотиков» и «Сравнение морфологических характеристик основных продуцентов антибиотиков при поверхностном и глубинном культивировании».

На втором занятии выполняется лабораторная работа «Определение концентрации антибиотика методом диффузии в агар».

На третьем предусмотрены две лабораторные работы:

• «Качественное определение антибиотиков омомицина[р] и галтамицина[р] в экстрактах культуральной жидкости с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силуфола»;

• «Качественное и количественное определение фузидовой кислоты».

На четвертом занятии - также две лабораторные работы:

• «Изучение микро-морфологических особенностей продуцентов БАВ (на примере продуцента омомицина[р] *Streptomyces chromopurpureos)* на разных стадиях культивирования (трофофаза, идиофаза) с выбором оптимальных условий процесса биосинтеза антибиотика (лабораторная работа заканчивается выполнением рисунка и описанием микроскопии изучаемого объекта)»;

• «Определение оптимальных параметров ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина* (при выборе оптимального процесса биосинтеза по предложенным параметрам требуется отражение динамики изменения показателей ферментации на одном графике с различными шкалами в соответствии с предложенным примером)».

Для каждой лабораторной работы приведены: цель и задачи, материальное обеспечение, сущность работы и методика ее выполнения.

Все занятия строятся по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед лабораторной работой, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОБЪЕКТОВ ДЛЯ СКРИНИНГА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРООРГАНИЗМОВ

Введение

Знания и умения по вопросам скрининга БАВ и созданию новых ЛС наряду с решениями вопросов эффективности, качества, безопасности и рентабельности также являются необходимыми для образовательного процесса современного специалиста-провизора. Навыки и умения по скринингу БАВ помогают реально оценивать ситуации и быть готовым к выполнению различных биотехнологических задач, касающихся выделения и культивирования продуцентов БАВ.

Краткие теоретические основы культивирования и определения морфологических характеристик микроорганизмов, а также скрининга биологически активных веществ

Природные биологически активные вещества и основные подходы для их скрининга

Природные БАВ - это прежде всего большой арсенал лекарственных соединений, продуцируемых микроорганизмами, которые представлены антибиотиками и другими фармакологически активными препаратами.

В настоящее время антибиотики являются основным средством для борьбы с инфекционными заболеваниями. К наиболее широко применяемым антибиотикам относят группы β-лактамов (пенициллины и цефалоспорины), макролидов (эритромицин и его аналоги), анзамицинов (рифамицины) и др. Наличие большого количества антимикробных препаратов, используемых в медицинской практике, не снимает вопроса о создании новых антибиотиков, необходимых прежде всего для лечения инфекций, вызванных природно-резистентными возбудителями, а также возбудителями с приобретенной резистентностью к большинству применяемых антибиотиков. Большую опасность представляют собой инфекции, вызываемые*Neisseria menigitidis, Bacillus anthracis, Clostridium perfringens.* Более того, развитие цивилизации сопровождается появлением новых возбудителей, ранее неизвестных в качестве патогенов. Так, с широким распространением капельных кондиционеров (обеспечивающих увлажнение и охлаждение за счет циркуляции влажного воздуха) отмечены случаи болезни легионеров, возбудитель которой - бактерия*Legionella sp.* - развивается в большом количестве и становится вирулентной при высокой аэрации и значительной влажности. Не так давно описано заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека. Применение препаратов с иммуносупрессивной активностью зачастую сопровождается развитием оппортунистических инфекций, среди которых наиболее тяжело поддаются лечению системные грибковые инфекции. Именно поэтому потребность в новых высокоэффективных антигрибковых препаратах ощущается очень остро. В настоящее время в клинической практике широко применяют такие соединения, как высокоспецифичный иммуносупрессор циклоспорин, макролидные структуры с иммуносупрессивной активностью (FK-506^{P}, рапамицин^{P}). Эти соединения одновременно являются и высокоактивными антигрибными антибиотиками. Важное место в клинической практике занимают природные соединения с гиполипидемической активностью - ловастатин и его аналоги. Во всем мире активно ведут поиск природных соединений, способных противостоять таким тяжелым заболеваниям, как рассеянный склероз, остеопороз, астма и т.д.

Скрининг новых БАВ - комплексная, многоэтапная и трудоемкая работа, которая включает:

• создание селективных условий для выделения из почвы микроорганизмов определенных таксонов;

• выделение микроорганизмов из почвы;

• использование потенциала коллекций культур микроорганизмов;

• определение чистоты выделенных культур;

• изучение способности культур образовывать антибиотики и другие БАВ как на агаризованной, так и в жидкой питательной среде;

• оценка культурально-морфологических и цитологических свойств выделенных культур;

• оптимизация условий биосинтеза;

• применение традиционных тест-культур и использование новых тест-моделей для определения активности БАВ;

• применение комплекса химических и биологических методов, позволяющих установить соединения с определенными химическими и биологическими свойствами;

• идентификация антибиотиков и других БАВ;

• оценка эффективности отобранных соединений в условиях *in vivo* на разработанных моделях определенных заболеваний.

Систематическое положение микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ *(Bacillus, Actinomyces, Fungi),* специфичность продуцируемых ими соединений. Выделение из почвы, культивирование и изучение морфологических характеристик микроорганизмов. Основные методы хранения микроорганизмов

Известные антибиотики и фармакологически активные соединения продуцируются самыми различными микроорганизмами. Поиск продуцентов БАВ ведут во всем мире уже более 50 лет. В настоящее время известно свыше 14 000 антибиотиков, образуемых микроорганизмами. В мире только около 200 из них используют в медицинской практике. Накопленный опыт показывает, что имеется определенная специфичность различных таксонов к продукции определенных химических структур в качестве вторичных метаболитов. Среди бактериальных культур распространены продуценты пептидных соединений (например, грамицидин, полимиксин). В среднем 70% описанных антибиотиков выделены из актиномицетов, причем на долю рода *Streptomyces* приходится более 90% продуцентов антибиотиков. Последнее определяется тем, что стрептомицеты удобны в работе, а традиционные методы их выделения, культивирования и проведения биосинтеза были разработаны уже в начале эры антибиотиков (Ваксман З., 1943). При скрининге отмечают способность

редких таксонов микроорганизмов к синтезу как принципиально новых структур, так и структурных аналогов известных групп антибиотиков с улучшенными свойствами. Грибные культуры широко известны в первую очередь как продуценты β-лактамных антибиотиков. В настоящее время именно грибные культуры применяют для синтеза фармакологически активных соединений, так как, будучи эукариотами, они имеют системы регуляции, близкие к системам макроорганизма. Примером может служить синтез стеролов (холестерина) у животных и эргостерола у грибов. Ловастатин,

продуцируемый грибными культурами, ингибирует биосинтез обоих стеролов. Эубактерии и актиномицеты относятся к прокариотам, т.е. являются организмами, не имеющими оформленного ядра и митохондрий. В отличие от них грибные культуры - эукариоты, у них присутствуют оформленное клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой; митохондрии, пластиды и другие органоиды.

Для выделения из почвы и культивирования микроорганизмов проводят следующие поэтапные исследования:

- отбор почвенных проб различных регионов;
- приготовление стерильных агаризованных сред, специфичных для бактерий, актиномицетов и грибов;
- приготовление почвенной суспензии и высев на агаризованные среды;
- культивирование микроорганизмов в оптимальных для разных родов и видов условиях;
- образование штаммов чистых культур;
- оценка морфологических и цитоморфологических характеристик выделенных культур.

Бактериальные культуры образуют на агаризованной среде круглые, гладкие или сморщенные колонии, вязкой консистенции, разных цветовых оттенков (чаще бежевых). Микроскопически бактерии представлены кокковидными или палочковидными формами. Диаметр бактерий обычно находится в пределах 0,5-2 мкм. Размножаются они делением. Бактерии, способные образовывать эндогенные споры, называются бациллами.

Актиномицеты в процессе роста образуют хорошо развитый мицелий. На агаризованных средах актиномицеты образуют колонии от 0,2 до 1 см в диаметре, таким образом, они обычно крупнее бактериальных. Колонии актиномицетов состоят из субстратного (погруженного в агар) и воздушного мицелия. Актиномицеты размножаются

спорами, которые формируются на воздушном мицелии. Мицелий и споры актиномицетов гидрофобны, что определяет кожистость и сухость их колоний. В отличие от бактерий многие актиномицеты образуют растворимый пигмент, благодаря которому среда вокруг колонии окрашена. К примеру, продуцент противоопухолевого антибиотика рубомицина* окрашивает среду культивирования в яркокрасный цвет.

К грибным культурам относятся дрожжи, мицелиальные грибы (дейтеромицеты) и шляпочные грибы (базидиомицеты). Дрожжи, как правило, используют в качестве продуцентов различных ферментов. Наиболее широко как продуценты БАВ и в поисковых исследованиях применяют мицелиальные грибные культуры. Грибной мицелий крупнее, чем у актиномицетов, d=5-10 мкм. На агаризованных средах они образуют крупные колонии, хорошо опушенные воздушным мицелием со спорами. Как и актиномицеты, они часто образуют растворимый пигмент.

С микроорганизмами, продуцирующими ценные БАВ, проводят генетико-селекционные исследования с целью получения высокоактивных клонов. Такие клоны имеют измененную морфологию. Наиболее выраженные морфологические отличия наблюдают у мутантов грибных культур. Так, зеленая пушистая плесень *Penicillium chrysogenum* - продуцент бензилпенициллина - образует колонии, закрывающие всю поверхность чашки Петри. Мутантный высокоактивный клон этой плесени образует высоко приподнятые над агаром колонии диаметром 0,5 см.

Демонстрационная часть 1

Студентам предлагается ознакомиться с чашками Петри, на которых представлен высев почвенной суспензии после 2-недельного культивирования, а также описать и охарактеризовать колонии бактерий, актиномицетов и грибов.

Кроме того, необходимо ознакомиться с различными почвенными микроорганизмами, выращенными в пробирках на скошенном агаре, и сравнить грибные культуры, продуцирующие циклоспорин (исходный штамм и высокоактивный мутантный штамм).

Выделенные из почвы в чистые культуры микроорганизмы исследуют микроскопически. С этой целью на предметное стекло наносят каплю стерильной воды, бактериологической петлей стерильно отбирают исследуемую культуру, суспендируют в водной капле, подсушивают на воздухе, фиксируют путем трехкратного кругового движения

предметного стекла над пламенем горелки, после чего мазок готов к окрашиванию. Чаще всего используют окраску метиленовой синью. Для этого готовят насыщенный раствор красителя, который разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10 000. Полученным раствором окрашивают подготовленные мазки. Окрашивание длится 3 мин. Для удаления избытка красителя стекло с обратной стороны мазка осторожно смывают струей воды. Препарат высушивают на воздухе, после чего он готов к микроскопическому исследованию: вначале при малом увеличении, затем при большом с иммерсионным маслом.

Окраска по Граму

На фиксированный препарат накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают 0,01% карболовый раствор генцианового фиолетового на 1-2 мин. Затем бумагу снимают и на препарат наносят раствор Люголя (раствор йода в йодистом калии), при этом образуется комплекс красителя с йодом и происходит почернение препарата. Затем препарат обесцвечивают этанолом. Комплекс красителя с йодом вымывается у микроорганизмов, имеющих клеточную мембрану, не пропускающую краситель в клетку. При дополнительном окрашивании карболовым фуксином эти культуры окрашиваются в малиновый цвет. Такие культуры получили название грамотрицательных. У грамположительных культур комплекс красителя с йодом проникает в клетку, окрашивая ее в фиолетовый цвет, который сохраняется также и при дополнительном окрашивании. Окраска по Граму очень важна при работе с бактериями.

Методы хранения микроорганизмов

Выделенные из почвы, отобранные в процессе скрининга мутантные высокоактивные штаммы (микроорганизмы-тесты) требуют к себе большого внимания с целью сохранения их в лабораторных условиях. Существуют следующие методы хранения микроорганизмов.

• Выделенные культуры хранятся в пробирках на агаризованных скошенных средах в течение 4-6 мес при +4 °С с последующим пересевом на свежие среды. Хранение культур на скошенных средах под слоем стерильного вазелинового масла осуществляется при +4 °С или при комнатной температуре.

• При необходимости длительного хранения используют лиофилизацию. Для этого в стерильные ампулы вносят выращенную культуру (на агаризованной или в жидкой питательной среде):

с агаризованной среды проводят смыв, и в пробу с культуральной жидкостью добавляют криопротектор (например, раствор трегалозы до 3%, глицерина до 1%). Затем ампулы закрывают стерильными ватными тампонами и подвергают лиофильной сушке, после чего запаивают и хранят при +4 °С или при комнатной температуре в течение 8-10 лет. Сразу после приготовления ампул и через каждые 2-3 г. проводят периодическую проверку качества хранящегося материала (процент выживаемости и активности). Подобным образом чаще всего хранят коллекционные культуры и культуры-продуценты БАВ.

• Хранят культуры и на плотных носителях, в стерильной почве в ампулах, куда вносится споровый материал. Культуры микроорганизмов, приготовленных для засева ферментеров, хранят и на специально приготовленных носителях (пшено, рис, отруби, и др.) Для этого распаренное стерильное зерно во флаконах засевают смывом спор, инкубируют до оптимальной стадии роста (спорообразования) и содержат при +4 °С или при комнатной температуре. В процессе хранения через определенные сроки культуры оживляют и определяют процент выживаемости.

В настоящее время большое распространение получило криохранение, когда материал подвергают глубокой заморозке в жидком азоте после добавления криопротектора.

Демонстрационная часть 2

Студентам необходимо ознакомиться с культурами, хранящимися на агаризованных скошенных средах под слоем стерильного масла; в ампулах в виде лиофилизированных культур; во флаконах на зерне.

Особенности биосинтеза микроорганизмов-продуцентов антибиотиков

Микроорганизмы синтезируют антибиотики при росте как на агаризованных средах, так и в условиях погружения в жидкую питательную среду. Антибиотики являются вторичными метаболитами, которые обычно образуются в ответ на пищевой дефицит. Основные факторы, влияющие на образование антибиотиков микроорганизмами: состав питательной

среды и условия культивирования. Главная задача при получении антибиотика - создание условий, при которых микроорганизм быстро наработает значительную биомассу и начнет синтез антибиотиков.

В Государственном научном центре антибиотиков (Москва) с использованием математических методов были разработаны универ-

сальные ферментационные среды для проведения поисковых работ среди бактерий, актиномицетов и грибных культур.

Состав ферментационной среды М-1 для первичного скрининга антибиотиков среди бактерий и актиномицетов, %:

- гороховая мука - 1,5;
- сахароза - 2,1;
- крахмал - 0,85;
- $NaNO_3$ - 0,5;
- $CaCO_3$ - 0,5;
- вода водопроводная, pH от 7,2 до 7,4.

Состав ферментационной среды А-9 для грибных культур, %:

- меласса - 2,0;
- соевая мука - 2,5;
- K_2HPO_4 - 0,5;
- глицерин - 3,0;
- соль поваренная - 0,5.

Среды разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера объемом 750 мл, закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху пергаментной бумагой, которую закрепляют тесьмой. Стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120 °С и давлении 0,8 атм. Засев колб осуществляют культурой, выросшей на плотной агаризованной среде. Микробиологическим крючком вырезают агаровый блок размером 1 $см^3$ и переносят в колбу с ферментационной средой. Засев проводят в стерильном боксе около пламени горелки. Продуцент в жидкой питательной среде в колбах культивируют в термостатируемой комнате на качалке при 180-220 об/мин. Ферментацию для бактерий и актиномицетов обычно проводят при 28 °С; для грибных культур - при 24 °С.

Задание для самоподготовки

Цели изучения темы занятия:

• научиться оперировать понятиями первичного и направленного скрининга;

• научиться анализировать и применять методы выделения микроорганизмов из почвы и проведения скрининга БАВ.

К занятию необходимо знать:

• схему выделения микроорганизмов-продуцентов антибиотиков из природных источников; основные этапы скрининга;

• методы оценки способности микроорганизмов продуцировать вещества, обладающие биологической активностью.

К занятию необходимо уметь:

• готовить почвенную суспензию (взвеси);

• делать посев на агаризованные среды;

• работать с микроскопом;

• различать продуценты антибиотиков по морфологическим признакам;

• оценивать особенности культуральной жидкости.

Контрольные вопросы

• Что используют в качестве продуцентов БАВ?

• Что обозначает понятие «антибиотики» и какие методы получения антибиотиков существуют в настоящее время?

• Что отличает «направленный» скрининг от «ненаправленного»?

• Как методически осуществляют выделение микроорганизмовпродуцентов антибиотиков из природных источников?

• Как можно оценить способность микроорганизмов продуцировать вещества с антимикробной активностью?

• Что означает понятие «фаза (стадия)» роста микроорганизма?

• Какие существуют способы хранения микроорганизмов-продуцентов?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Биотехнология антибиотиков».

2. Настоящее пособие.

3. *Бибикова М.В., Иваницкая Л.П.* Современные проблемы поиска природных антибиотиков // Лекарственные средства, экономика, технология и перспективы получения, обзорная информация. - М.: Минмедпром, 1990. - Вып. 7. - С. 3-47.

Дополнительная

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках: учебник для студентов биологических специальностей университетов. - М.: Высшая школа, 2005.

2. *Ланчини Д., Паренти Ф.* Антибиотики: пер. с англ. - М.: Мир,

1985.

3. *Шлегель Г.* Общая микробиология: пер. с нем. - М.: Мир, 1987.

4. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье: издание XI, вып. 2. - М.:

Медицина, 1990. - С. 210-225.

Лабораторная работа ? 1 Поиск и характеристика микроорганизмов-продуцентов

антибиотиков

Цели работы: научиться высевать почвенные образцы на агаризованные среды и определять по морфологическим признакам в смешанных популяциях на чашках Петри актиномицеты, микромицеты, дрожжи и бактерии. Классифицировать по таксономической принадлежности культуры, выделенные по морфологическим и цитологическим признакам в чистые культуры.

Целевые задачи

• провести посев почвенного образца на агаризованные среды в чашки Петри;

• оценить макроморфологические признаки микромицетов, актиномицетов, дрожжей, бактерий;

• идентифицировать по микроморфологическим признакам микромицеты, актиномицеты, дрожжи, бактерии.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

- образцы почв;

- стерильные чашки Петри;

- стерильные пипетки;

- стерильная вода в пробирках и колбах;

- стерильные шпатели;

- среда стерильная агаризованная (Гаузе 1);

- емкость для плавления агаризованной среды;

- наборы культур микроорганизмов в пробирках и чашках;

- метиленовая синь;

- предметные стекла;

- фильтровальная бумага;

- микробиологические петли. *Приборы:*

- весы;

- микроскоп;

- осветитель к микроскопу;

- газовая горелка;

- шуттель.

Суть работы

Оценка морфологических и цитоморфологических характеристик выделенных из почвы микроорганизмов.

Подготовительный этап

Приготовление стерильной посуды

• Для выделения из почвенных субстратов микроорганизмов готовят стерильную воду, разлитую по 50-100 мл в колбы Эрленмейера емкостью 250 мл и по 10 мл в пробирки.

• Колбы и пробирки с водой закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху пергаментной бумагой, которую закрепляют тесьмой. Стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

• Пипетки, шпатели, чисто вымытые и просушенные в сушильном шкафу, заворачивают в тонкую бумагу. В верхнюю часть пипеток предварительно помещают ватный тампон. Стерилизацию проводят в сушильном шкафу при 120 °С в течение 3 ч.

Приготовление агаризованных сред для выделения микроорганизмов Для выделения актиномицетов используют среду Гаузе 1, содержащую (%):

• крахмал - 2,0;

• $MgSO_4 * 7H_2O$ - 0,05;

- KCl - 0,05;
- K_2HPO_4 - 0,05;
- KNO_3 - 0,1;
- $FeSO_4 * 7H_2O$ - 0,001;
- агар-агар - 1,5;
- дистиллированную воду с pH=7,0.

Для выделения грибов используют среду Чапека (%):

- глюкоза - 2,0;
- $NaNO_3$ - 0,2;
- K_2HPO_4 - 0,1;
- $MgSO_4 * 7H_2O$ - 0,05;
- KCl - 0,05;
- $FeSO_4 * 7H_2O$ - 0,001;
- агар-агар - 1,5;
- дистиллированная вода, pH от 6,8 до 7,2.

Для выделения бактерий используют глюкозо-дрожжевую среду, %:

- глюкоза - 2,0;
- $CaCO_3$ - 1,0;
- дрожжевая вода;
- агар-агар - 1,5;
- дистиллированная вода, pH - около 7,0.

Приготовленные среды разливают по 500 мл в микробиологические матрацы, закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху пергаментной бумагой, которую закрепляют тесьмой. Стерилизуют в автоклаве при 120 °С, 0,8 атм в течение 30 мин.

Приготовление почвенной суспензии и высев на агаризованные среды

Взвешивают 1 г почвы, специально отобранной в различных регионах страны и хранящейся в лаборатории в холодильнике, и вносят в колбу со стерильной водой. Колбу встряхивают на качалке или шуттеле 15-20 мин до получения равномерной суспензии и вымывания спор микроорганизмов из почвенных комочков.

• Приготовленные ранее матрацы с агаризованной средой помещают на водяную баню для расплавления среды, которую далее охлаждают до 50-70 °С и разливают в чашки Петри по 15-20 мл при диаметре чашек 90-100 мм соответственно. Чашки с застывшим агаром помещают в стерильный бокс, немного приоткрывают крышки и подсушивают в течение 20-30 мин, чтобы избежать образования сплошного газона растущих микроорганизмов.

• Полученную суспензию спор разводят в стерильной воде от 1:10 до 1:10,8 и по капле наносят на поверхность агаризованной среды в чашки Петри. Стерильным шпателем растирают каплю по всей поверхности среды. Для выделения микроорганизмов необходимо, чтобы на одной чашке вырастало около 100 колоний, достаточно удаленных друг от друга, поэтому рабочими разведениями чаще всего являются 1:10,5-1:10,7.

• Засеянные чашки помещают в термостат. Для выделения бактерий и грибов их обычно инкубируют при 24 °С, для выделения актиномицетов - при 28 °С. Для выделения термотолерантных или психрофильных микроорганизмов используют специальные условия. Так, для выделения редких актиномицетов рода*Micromonospora* чашки инкубируют при 37 °С 2-3 дня с последующим доращиванием в течение 7-12 сут. Такой же срок допустим для большинства культур, при этом в течение всего срока роста чашки просматривают.

• Выросшие единичные колонии отсеивают в пробирки со скошенной агаризованной средой того же состава соответственно виду микроорганизма и инкубируют в термостате при оптимальной температуре. По окончании роста пробирки с культурой просматривают, отбраковывают смешанные популяции, остальные

хранят в холодильнике и используют для определения биологической активности.

Порядок выполнения работы

• Приготовление почвенной взвеси: взвешивают 1 г почвы, помещают в колбочку со 100 мл стерильной водопроводной воды. Встряхивают смесь на шуттеле или вортексе в течение 10 мин, затем отстаивают еще 10 мин для осаждения неразбитых комочков почвы.

• Заранее приготовленную, стерильную агаризованную среду Гаузе 1 расплавляют на водяной бане, остужают до 45-50 °С и разливают в стерильные чашки Петри.

• Готовят разведения почвенной суспензии до 10-5-10-7 в воде. Пробу в количестве 0,5 мл из полученного разведения наносят на поверхность агаризованной среды в 3 чашках Петри. Стерильным шпателем суспензию растирают по поверхности агара.

• Засеянные чашки помещают в термостат (инкубируют при 28 °С 14 сут).

• Проводят визуальную оценку микроорганизмов, выросших на агаризованных средах после высева различных образцов почвы (приготовлены заранее преподавателем). Оценивают разнообразие выросших микроорганизмов.

• При помощи микробиологической петли на скошенный агар в пробирки выделяют 2-3 колонии.

• Проводят оценку морфологической специфики коллекции культур микроорганизмов в пробирках.

• Готовят мазки различных культур на предметных стеклах, которые фиксируют и окрашивают метиленовой синью или по Граму.

• Готовые мазки просматривают под микроскопом.

Лабораторная работа ? 2 Сравнение морфологических характеристик основных продуцентов при поверхностном и глубинном культивировании

Цель работы: ознакомление с глубинными культурами продуцентов: микромицетами-продуцентами циклоспорина *(Tolipocladium inflatum);* стрептомицетами *Streptomyces chromopurpureus subsp.* - продуцентами двух антибиотиков - противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда галтамицина[р] и *Streptomyces chiketomanus subsp. nov* - продуцентами ветеринарного ионофорного кокциди-

остатика омомицина; бациллой *Bacillus polymyxa* - продуцентом полимиксина.

Целевые задачи

• провести изучение макро- и микроморфологических признаков продуцентов при росте на плотной агаризованной среде и при глубинном культивировании в колбах;

• выбрать чашку Петри с поверхностным ростом культуры, морфологически соответствующую культуре в колбе в жидкой питательной среде.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• образцы культуральной жидкости в трех вариантах;

• чашки Петри с газоном продуцента;

• пипетки стеклянные;

• стекла предметные;

• метиленовая синь;

• бумага фильтровальная. *Приборы:*

• микроскоп;

• горелка газовая.

Суть работы

На представленных образцах (выросших в чашках Петри и в жидкой питательной среде в колбах) изучить микро- и макроморфологические признаки и определить, какому продуценту соответствует рост в жидкой и на плотной агаризованной среде.

Порядок выполнения работы

На предметное стекло при помощи стеклянной пипетки наносят образец культуральной жидкости, растирают той же пипеткой по поверхности стекла и подсушивают на воздухе или над пламенем горелки. Стекло при подсушивании в пламени горелки не должно перегреваться. После высыхания пробы фиксируют, проводя их 5 раз в пламени горелки. После того как стекло остыло, наносят метиленовую синь. Выдерживают 30 с и смывают краску с противоположной стороны стекла (относительно мазка) под тонкой струей воды так, чтобы капли воды слегка омывали мазок до стекания чистой воды с мазка. Вновь подсушивают стекло и микроскопируют. Проводят описание и зарисовку видимого в микроскопе образца, определяя, к какому роду относится

продуцент, а затем сопоставляют его с макроморфологическим типом, представленным на плотной агаризованной среде на чашках Петри.

Контрольные вопросы

- Каково значение коллекций культур микроорганизмов и какие существуют методы хранения микроорганизмов?
- Как определить чистоту выделенных культур?
- Как провести оценку морфологических и цитологических свойств выделенных культур?
- С помощью каких воздействий можно влиять на рост и развитие микробной популяции?
- Назовите основные группы антибиотиков, образуемых актиномицетами.
- Назовите основные группы антибиотиков, образуемых микроскопическими грибами.
- Какие антибиотики образуются эубактериями?
- Как по макроморфологическим признакам отличить *Bacillus, Actinomyces, Fungi?*

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Введение

Знание методов выделения БАВ и умение применять их при установлении качества (определение подлинности) и при количественной оценке (количественный анализ) полученного продукта - неотъемлемая часть профессионального образования провизора. Известно, что антибиотики, полученные биотехнологическими методами, составляют значительную часть ЛС на фармацевтическом рынке как в нашей стране, так и за рубежом. Иногда часть такой продукции присутствует в виде различных фальсификаций,

которые представляют серьезную опасность для здоровья потребителей. Провизор должен знать особенности биотехнологического производства антибиотиков, а также уметь определять качество и количество целевого продукта, то есть, осуществлять контрольные функции по безопасности и эффективности предлагаемых антибиотиков.

Для определения антибиотикочувствительности и концентрации антибиотиков в растворах, биологических жидкостях и тканях существуют как специальные, так и принципиально схожие методы контроля. Метод диффузии в агар и метод серийных разведений в жидкой питательной среде - наиболее простые и доступные микробиологические методы. При их применении для изучения терапевтического индекса и концентрации (активности) антибиотиков целевые задачи, соответственно, будут различаться.

Краткие теоретические основы микробиологических методов определения чувствительности и концентрации антибиотиков

Изучение антибиотикочувствительности

Конечная цель исследования антибиотикочувствительности возбудителей инфекционных болезней - прогнозирование эффективности лечения на основе данных по чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) *in vitro.*

Главным показателем антибиотикочувствительности, независимо от метода определения, является величина минимальной подавляющей концентрации (МПК) или минимальной ингибирующей концентрации (МИК), то есть минимальная концентрация АБП, задерживающая рост испытуемого штамма микроорганизма в стандартном опыте. Измеряют МИК и МПК в мкг/мл или в единицах действия (МЕ, ЕД). Для проведения исследований антибиотикочувствительности используют выделенные у больного штаммы микроорганизмов и стандартные растворы антибиотиков на носителе в определенной концентрации. При определении МПК (МИК) методом диффузии в агар используют диски или полоски. В диск-диффузионном методе в качестве носителя применяют бумажные диски, пропитанные антибиотиком, в Е-тесте или эпсилометрическом тесте - узкую полоску полимера (0,5χ6,0 см), которая также как и диски пропитана различными концентрациями АБП (от минимальной до максимальной на одной полоске). Величину МПК фиксируют в том месте, где граница зоны ингибиции роста вплотную подходит к носителю. Оценку чувствительности производят по величине терапевтического индекса Т:

Т = МИК/К,

где К - концентрация данного антибиотика (мкг/мл) в очаге инфекции (или в крови) при введении терапевтических доз препарата.

Значения К можно найти в специальных таблицах. При значении Т менее 0,3 принято считать, что антибиотик клинически эффективен.

В настоящее время для оценки антибиотикочувствительности микроорганизмов разработаны также генотипические методы, основанные на прямой детекции генов,

кодирующих детерминанты устойчивости к АБП. Это перспективные методы, однако до настоящего времени их практическое применение ограничено в связи с особыми требованиями к аппаратурному оснащению и устройству лабораторий. Для прямой детекции детерминантов устойчивости используют ДНК-ДНК гибридизацию, амплификацию в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и некоторые другие методы.

Определение концентрации (активности) антибиотиков

В отличие от исследования антибиотикочувствительности определение концентрации антибиотиков в культуральной жидкости, растворах, биологических жидкостях и тканях не требует установления МПК. В данном случае необходимо рассчитать количество антибиотика по величине зон подавления роста тест-микроорганизма (или мутности культуральной жидкости) по сравнению со стандартными растворами антибиотика. Для исследования концентрации антибиотика используют коллекционные тест-микроорганизмы. Метод основан на сравнении степени угнетения роста тест-микроба определяемыми концентрациями антибиотика в испытуемом материале с угнетением его роста известными концентрациями стандарта этого же антибиотика. Стандартами служат специально изготовленные очищенные образцы антибиотиков, активность которых устанавливают по международным стандартным препаратам. Их хранят в запаянных ампулах при температуре 4-10 °С. На этикетках указано содержание единиц действия или микрограммов активного вещества в 1 мг препарата.

Антибактериальную активность выражают в единицах действия (ЕД). Для большинства антибиотиков (стрептомицин, антибиотики тетрациклинового ряда, канамицин и т.д.) 1 ЕД соответствует 1 мкг химически чистого препарата, а 1 мг такого препарата содержит 1000 ЕД. Для некоторых антибиотиков единицы действия были введены до получения химически чистых препаратов, в связи с чем единица действия для них не соответствует 1 мкг химически чистого вещества (пенициллин, полимиксин, нистатин).

Метод диффузии в агар

Метод основан на феномене ингибирования антибиотиком видимого роста микроорганизмов на плотной (агаровой) питательной среде. Градиент концентрации антибиотика в питательной среде создается в результате его диффузии из пропитанного антибиотиком диска или непосредственно из лунки с раствором. Диск с антибиотиком (или раствор в лунке) помещают на питательную среду сразу же после посева (инокуляции) культуры исследуемого микроорганизма. При этом практически одновременно начинаются два процесса: диффузия антибиотика из диска (лунки) и рост микроорганизмов. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков (лунок). Результат учитывают по величине диаметра зоны подавления роста вокруг диска (лунки), измеренной в миллиметрах.

Методом диффузии в агар можно определить концентрацию всех антибиотиков, в том числе содержащихся в жидкостях и тканях организма.

Существуют два варианта этого метода:

1) трехдозный, когда для проведения анализа готовят по 3 концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов;

2) однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке.

Расчет активности и дисперсионный анализ трехдозного варианта осуществляют в соответствии со статьей «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [Государственная фармакопея (ГФ) XI, вып. 1, с. 199].

Для определения концентрации антибиотиков испытуемый раствор вносят в специальные лунки на агаровых пластинках или в цилиндрики (без разведения, если предполагаемая концентрация антибиотика не превышает контрольную величину, либо разводят нормальной сывороткой человека, бычьей сывороткой или соответствующим каждому антибиотику буферным раствором). Некоторые биологические жидкости (бычья сыворотка, вытяжка из тканей и т.д.) сами по себе способны изменять диаметр зон ингибиции, поэтому их вносят в лунку в качестве контроля. Так, диаметр зон ингибиции увеличивается при взаимодействии антибиотика карбомицина^{р} с бычьей сывороткой. Аналогично увеличивается диаметр зон ингибиции при определении содержания антибиотиков в молоке, которое разводят фосфатным буфером в соотношении 1:3.

Диффузионный метод определения активности занимает 16-18 ч. Существуют ускоренные методы, с помощью которых результаты получают уже через 3-5 ч. «Ускорения» достигают путем увеличения посевной дозы тест-культуры на 1 мл питательной среды; повышением температуры инкубации до 38-45 °С или окрашиванием плохо видимых зон и слабовыраженных микробных газонов через 3-5 ч инкубации. В последнем случае поверхность питательной среды обрабатывают 2% раствором красной кровяной соли или 1% раствором железоаммиачных квасцов. Микробный газон при этом окрашивается в темно-синий цвет, на фоне которого четко вырисовываются светлые зоны подавления роста.

Разработка ускоренных методов определения концентраций в крови и тканях имеет наибольшее значение для антибиотиков группы аминогликозидов. Вследствие незначительного разрыва между терапевтической и токсической концентрацией даже небольшое превышение ее пограничного уровня, который для гентамицина и тобрамицина составляет 6-8 мкг/мл, для сизомицина - 4-6 мкг мл, канамицина - 15-20 мкг/мл, стрептомицина - 25-30 мкг/мл, может сопровождаться побочными реакциями (ото- и нефротоксичность).

Метод серийных разведений

Принцип метода заключается во внесении одинаковой дозы испытуемых микроорганизмов (или тест-микроба) в питательные среды с различной концентрацией антимикробных (или исследуемых) веществ с последующим определением минимальной

подавляющей концентрации (при изучении антибиотикочувствительности), мутности или изменения окраски культуральной жидкости по сравнению со стандартным препаратом (при определении концентрации антибиотика).

Питательную среду (обычно это среда Гисса с глюкозой и реактивом Андреде или фенолсывороточная среда) заражают стандартной взвесью определенного для каждого антибиотика тест-микроба из расчета 10 000 микробных клеток на 1 мл среды. Зараженную среду разливают по 0,2 или 0,5 мл в стерильные пробирки. Для каждого образца готовят 2 ряда по 10 пробирок в каждом. Первый ряд служит для разведения раствора стандартного антибиотика, второй - для разведения испытуемого материала. Разведения (двукратные, последовательные) испытуемого раствора и стандартного образца производят в объеме 0,2 или 0,5 мл засеянной среды. Контролем опыта служат незараженная (контроль прозрачности и стерильности) и

зараженная соответствующим тест-микробом (контроль роста культуры) среды. Результат учитывают после 16-18 ч инкубации при 37 °С и оценивают его по изменению цвета (среда Гисса становится розовой, фенолсывороточная - из красной при pH=7,2 становится желтой в результате сбраживания микроорганизмами глюкозы и изменения pH) и помутнению среды (нефелометрически).

Для установления концентрации антибиотика в исследуемом образце умножают наибольшее разведение раствора исследуемого образца, задерживающее рост тест-микроба (разведение в последней пробирке с прозрачной, не изменившей цвет средой), на наименьшую концентрацию стандарта антибиотика в пробирке с отсутствием роста. Полученная величина соответствует содержанию антибиотика в 1 мл исследуемого образца.

В приведенном в табл. 1 примере стандарт пенициллина задерживает рост тест-микроба при концентрации антибиотика, равной 0,025 ЕД/мл, а испытуемая сыворотка - в разведении 1:8. Содержание пенициллина в разведенной сыворотке соответствует 0,025x8=0,2 ЕД/мл.

Таблица 1. Определение содержания пенициллина в сыворотке

Разведение сыворотки	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Рост тест-микроба	–	–	–	+	+	+
Концентрация стандарта пенициллина в среде, ЕД/мл	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063
Рост тест-микроба	–	–	–	–	+	+

Примечание: (+) - рост тест-микроба, (-) - отсутствие роста.

Микрометод. В настоящее время метод серийных разведений при определении антибиотикочувствительности и антимикробной активности модифицирован в микрометод с применением 96-луночных планшетов для иммунологических исследований. Концентрацию рабочих растворов антибиотиков, вносимых в лунки планшета, рассчитывают исходя из схемы последующей инокуляции, которая должна

основываться на необходимости создания $5x10^5$ КОЕ/мл (КОЕ - колониеобразующая единица).

На практике применяют два варианта микрометода.

В первом варианте концентрация антибиотика в рабочем растворе, приготовленном на жидкой питательной среде, равна заданной.

В этом случае объем инокулята должен составлять не более 10% от объема в лунке. Так, если рекомендованный объем раствора антибиотика в лунке будет составлять 0,1 мл, объем инокулята - 0,01 мл, то его концентрация - $5x10^5$ КОЕ/мл.

Во втором варианте концентрация антибиотика в рабочем растворе должна быть в 2 раза больше, чем заданная. Рекомендуемый объем раствора антибиотика - 0,05 мл, объем инокулята - также 0,05 мл, а его концентрация - 10^6 КОЕ/мл, т.е. $5x10^5$ КОЕ/мл х 2.

После внесения рабочих растворов антибиотиков в лунки запаянные в полиэтилен планшеты могут храниться при температуре ниже -60 °С до момента использования. Повторное замораживание и оттаивание недопустимо.

Для проведения исследований планшеты после извлечения выдерживают до достижения ими комнатной температуры. Доведенную до заданной концентрации по стандарту мутности культуру инокулируют не позднее чем через 15 мин после приготовления и инкубируют 16-20 ч при 37 °С. Учет результатов осуществляют как при макрометоде - визуально, по появлению видимой мутности, либо спектрофотометрически. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста.

Несмотря на сходство методических подходов, как определение чувствительности (устойчивости) микроорганизмов, так и определение концентрации антибиотика имеют свою специфику. Именно поэтому необходимо различать применение методов серийных разведений и диффузии в агар для определения чувствительности (устойчивости) микроорганизмов от таковых для определения активности (концентрации) антибиотиков.

Наряду со стандартными методами существуют также и специальные методы для определения концентрации антибиотиков (физикохимические, радиоиммунологические, ферментные и др.), которые являются более точными и занимают меньше времени, однако для их проведения требуется специальное оборудование и реагенты. В то же время при создании новых антибиотиков или усовершенствовании технологии на стадии «отработки» биотехнологического процесса необходимо контролировать содержание антибиотика одновременно как стандартными, так и специальными методами. Это позволяет определить потери на стадии выделения и очистки. Например, при промышленном получении антибиотиков химические методы контро-

ля культуральной жидкости требуют предобработки образца (экстракция, отделение примесей), что влечет за собой потерю антибиотика.

Стандартизация методов определения концентрации антибиотиков и чувствительности к ним

Для получения воспроизводимых результатов необходима строгая стандартизация опытов. Скорость диффузии растворов в агар зависит от химической природы антибиотиков, состава и pH агаровой среды и буфера, в котором готовят рабочие растворы; стандарта и испытуемого материала; температуры и времени инкубации. Именно поэтому при определении концентрации антибиотиков в испытуемых субстратах подбирают определенные условия для культивирования тесткультур, оптимальные по составу и pH питательные среды, буферные растворы, обеспечивающие максимальную диффузию раствора антибиотика в среду и четкость очертания зон.

Стандартизацию осуществляют по описанным ниже параметрам.

Состав питательной среды:

• ионы $Ca^{2}+$, $Mg^{2}+$, $Zn^{2}+$ являются антагонистами некоторых АБП, поэтому при повышении их концентрации величина зон подавления может существенно изменяться; в стандартных питательных средах концентрация ионов должна составлять для $Ca^{2}+$ - 20-25 мг/л, для $Mg^{2}+$ - 10-12,5 мг/л;

• концентрация питательных веществ существенным образом влияет на скорость роста и метаболическую активность микроорганизмов - чем среда богаче питательными веществами, тем выше скорость роста микроорганизмов и соответственно меньше диаметр зоны ингибиции роста и выше значение МПК.

Величина посевной дозы микроорганизма (инокулюм-эффект)

• Длительность лаг-фазы непосредственным образом связана с величиной посевной дозы микроорганизмов. При очень высокой концентрации инокулята длительность лаг-фазы может сокращаться до 10-20 мин.

Выраженный инокулюм-эффект характерен для штаммов, продуцирующих некоторые ферменты, к примеру β-лактамазы. Увеличение концентрации инокулята с 10^{5} КОЕ/мл до 10^{7} КОЕ/мл может привести к резкому снижению не только зон ингибиции, но и уровня МПК.

• Исходное физиологическое состояние исследуемой культуры и тест-микроорганизма, длительность и температурный режим инкубации.

• Культуры микроорганизмов, длительное время хранившиеся на плотных или в жидких питательных средах, обладают пониженными ростовыми свойствами. В подавляющем большинстве случаев для оценки чувствительности необходимо использовать культуры после 16-18 ч инкубации.

• Температура инкубации может привести как к торможению, так и к увеличению скорости роста.

• При преждевременном учете результатов (особенно в методах серийных разведений) возможна ошибочная оценка, при которой устойчивые штаммы принимают за чувствительные. При поздней оценке результатов возможна селекция устойчивых мутантов.

Основа поддержки стандартности проведения исследований - постоянный внутрилабораторный контроль качества их проведения. Такой контроль предполагает периодическое (не реже 1 раза в неделю) проведение исследований антибиотикочувствительности контрольных (референсных) штаммов. Контрольные штаммы характеризуются стабильностью фенотипических признаков и прежде всего чувствительностью к АБП. Если результаты оценки чувствительности контрольных штаммов соответствуют их паспортным характеристикам, то это свидетельствует о стандартности метода и условий проведения исследования.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: освоить принципиальный (методологический) подход к изучению активности антибиотиков на разных этапах их получения и к контролю в соответствии с требованиями ГФ СССР (издание XI, вып. 2 по определению биологической активности антибиотиков).

К занятию необходимо знать:

• микробиологические методы исследования антибиотиков;

• принцип метода серийных разведений для определения активности (концентрации) антибиотиков;

• принцип диффузионного метода применительно к изучению активности (концентрации) антибиотиков;

• параметры стандартизации методов определения концентрации антибиотиков и чувствительности к ним.

К занятию необходимо уметь:

• готовить агаризованные питательные среды;

• готовить суспензию тест-микроба в требуемом для исследования разведении с использованием стандарта мутности;

• готовить чашки Петри с питательной средой;

• инокулировать питательную среду тест-микробом;

• готовить рабочие растворы стандарта антибиотика и исследуемого препарата;

• вносить испытуемые растворы и инкубировать в термостате при требуемой температуре и времени для микроорганизма, взятого в качестве теста;

• измерять диаметр зон;

• рассчитывать активность (концентрацию) испытуемого препарата с применением стандартной кривой и табличных данных.

Контрольные вопросы

• Почему практическое применение генотипических методов для оценки антибиотикочувствительности в настоящее время ограничено?

• В чем выражается антибактериальная активность?

• Что является главным показателем антибиотикочувствительности независимо от метода определения?

• Что можно определять методом диффузии в агар, и какие варианты этого метода существуют?

• В чем заключается принцип метода серийных разведений?

• Почему в некоторых случаях содержание антибиотика необходимо контролировать одновременно как стандартными, так и специальными методами?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Биотехнология антибиотиков».

2. Настоящее пособие.

3. *Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия: справочник: 4-е изд. - М.: Медицина, 1982.

Дополнительная

1. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. - М.: Медицина, 2004.

2. Государственная фармакопея СССР: издание XI, вып. 2. - М.: Медицина, 1990.

Лабораторная работа ? 3 Определение концентрации антибиотика методом диффузии в агар

Цель работы: на основе знаний методологии проведения микробиологического контроля активности антибиотиков диффузионным методом научиться применять его на практике и рассчитывать содержание антибиотиков в растворе, биологических жидкостях и тканях.

Целевые задачи

- освоение правил работы в лаборатории с биообъектами;
- проведение оценки активности антибиотиков в растворе:

- измерение зон задержки роста тест-микроба;

- построение графической зависимости дозы антибиотика от величины диаметра зоны задержки роста тест-микроба для стандартных и опытных растворов антибиотиков;

- использование графической зависимости и стандартной таблицы для расчета активности (концентрации) антибиотиков.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

- пробирки стерильные объемом 20 мл;
- чашки Петри стерильные;
- пипетки стеклянные объемом от 1 до 10 мл;
- стерильные цилиндры из алюминия или нержавеющей стали;
- пинцет стерильный;
- суспензия тест-микроба;
- стандарт антибиотика;
- агаризованная питательная среда;
- стандарты мутности;
- стерильный физиологический раствор. *Приборы:*
- термостат;
- ламинарный шкаф;
- водяная баня или СВЧ-печь для расплавления агаризованной питательной среды;
- весы аналитические;

столик с уровнем.

Суть работы

Определение активности антибиотика с использованием стандартной кривой.

Подготовительный этап

Подготовка чашек со средами и тест-микробом. Определение концентрации антибиотика можно проводить на двух или одном слое питательной среды, разлитой в чашки Петри. Для нижнего слоя используют «голодные» незасеянные среды, для верхнего слоя агаризованную среду засевают соответствующим тест-микробом. Каждому антибиотику соответствует среда с определенным содержанием аминного азота.

Питательную среду заражают взвесью соответствующего тестмикроба. Для этого в предварительно расплавленную и охлажденную до 48-50 °С агаризованную среду вносят вегетативные клетки*(Staphylococcus aureus* 209Р, *Candida albicans* и т.д.) или взвесь спор *(Bacillus cereus, Bacillus subtilis).* О способах выращивания и хранения тест-культур см. в «Государственной фармакопее».

Посевная доза тест-микроба должна быть предварительно установлена для каждой серии среды в пределах цифр, указанных для определения активности антибиотиков в ГФ.

Приготовление рабочих растворов стандарта антибиотика и испытуемого материала. Для приготовления раствора стандарта антибиотика точную навеску растворяют в соответствующем растворителе из расчета 1 мг в 1 мл или 1000 ЕД в 1 мл (основной раствор). Дальнейшие растворы готовят путем разведения основного раствора до нужной концентрации.

Порядок выполнения работы

В связи с тем что линейную зависимость между концентрациями и величиной зон задержки роста тест-микроба обнаруживают только в определенном интервале концентраций, растворы стандарта антибиотика должны быть точно подобраны. Для стандарта каждого антибиотика определяют концентрацию раствора, которая обеспечивает образование оптимальных зон задержки роста тест-культуры (контрольная концентрация). Такой концентрацией для бензилпенициллина является 1 ЕД/мл, для олеандомицина - 4 мкг/мл, эритромицина - 1 мкг/мл и т.д. В стандартных условиях опыта при применении контрольных концентраций величина зон подавления роста колеблется в пределах 16-18, 17-19 мм. При при-

готовлении разведений испытуемого материала стремятся создать концентрации антибиотиков в пределах, близких к контрольной концентрации стандарта.

Приготовленные разведения стандарта антибиотика и испытуемого материала вносят в стерильные цилиндры из нержавеющей стали или алюминия, которые помещают на поверхность застывшей питательной среды чашек Петри (по 6 в каждой чашке), а также в лунки или на бумажные диски. Растворы стандарта и испытуемого образца вносят в количестве 0,1 л, чередуя стандартный и испытуемый растворы. Для каждого испытания используют не менее 3 чашек. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 18 ч, затем цилиндрики сбрасывают и измеряют диаметры зон задержки роста тест-микроба, образуемых испытуемыми растворами.

Расчет активности испытуемого препарата

Концентрацию антибиотика в испытуемом субстрате определяют по стандартной кривой, для построения которой используют пять концентраций раствора стандартного препарата. Одна из концентраций является контрольной. По ней вносят поправки для всех других концентраций. Применяемые для построения кривой концентрации не должны отличаться от контрольной более чем в 2 раза. Для каждой концентрации, кроме контрольной, используют 3 чашки (всего 12). В 3 цилиндрика или лунки каждой чашки вносят раствор контрольной концентрации, в 3 другие - одну из взятых концентраций стандарта. После измерения зон задержки роста для каждой концентрации выводят среднюю величину зоны на 3 чашках, затем находят среднюю величину зоны для контрольной концентрации на всех чашках (12х3=36 зон).

По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации для всех чашек и средней величиной зоны контрольной концентрации, определенной для 3 чашек с отдельными концентрациями, находят поправку к величине зоны данной концентрации. Поправку прибавляют к средней величине зоны данной концентрации, если она положительная, и вычитают, если поправка отрицательная.

В процессе выполнения работы требуется:

• измерить диаметр зон подавления роста тест-микроба на чашках Петри при внесении различных концентраций растворов антибиотика-стандарта и построить график зависимости диаметра зоны подавления роста тест-микроба от концентрации антибиотика;

• измерить диаметр зон подавления роста тест-микроба на чашках Петри при внесении растворов испытуемого антибиотика и рассчитать концентрацию с использованием:

- полулогарифмической сетки с нанесенным на ней графиком стандарта антибиотика,

- стандартной таблицы расчета активности (концентрации) антибиотика;

• в предложенном варианте задания с учетом исходных данных рассчитать разведение стандарта антибиотика и использовать этот результат при расчете концентрации испытуемого раствора (примеры расчетов приведены в приложении).

По окончании работы необходимо оформить протокол по следующей схеме: тема, цель, методика, график зависимости активности стандарта антибиотика от диаметра зон угнетения роста, расчет активности испытуемого раствора по логарифмической сетке, расчет активности испытуемого раствора с использованием стандартной таблицы для расчета активности антибиотиков, выводы (указать, соответствует ли заявленная концентрация полученным результатам эксперимента по предложенной задаче).

Контрольные вопросы

• Какие существуют методы микробиологического контроля для определения концентрации антибиотиков?

• В чем заключается суть метода диффузии в агар?

• Какой метод определения концентрации антибиотиков считается наиболее точным и в чем заключается его сущность?

• Что такое «стандарт антибиотика» и для чего его применяют?

• Что такое «тест-микроорганизмы» («тест-микробы») и какие методы стандартизации при их применении вы знаете?

В чем состоят принципиальные различия между определением антибиотикочувствительности и определением содержания антибиотика методом диффузии в агар?

• На каких этапах получения антибиотиков применяют микробиологические методы определения активности?

Приложение

Пример расчета поправки

Средняя величина зоны подавления контрольной концентрации 1 мкг/мл равна 19,2 мм (выведено из 36 зон). Средняя величина

зоны для той же концентрации, выведенная из 3 чашек, равна 19 мм. Величина поправки составляет +0,2 мм. Средняя величина зоны подавления для концентрации 0,8 мкг/мл составляет 17,9 мм, после внесения поправки: 17,9 мм + 0,2 мм = 18,1 мм. Аналогично необходимо исправить значения величин зон для остальных концентраций, используемых при построении стандартной кривой.

Для расчета активности антибиотиков по исправленным значениям величин зон взятых концентраций и средней величине зоны контрольной концентрации на полулогарифмической сетке строят стандартную кривую, откладывая по оси абсцисс величины зон напротив значений соответствующих концентраций по оси ординат. При постоянных условиях опыта стандартной кривой можно пользоваться длительно, проверяя угол наклона кривой для каждой вновь приготовленной серии питательной среды по 2-3 концентрациям стандарта на 3-5 чашках.

При определении концентрации антибиотика в сыворотке или другом материале испытуемый субстрат разводят соответствующим растворителем до уровня, который предположительно соответствует контрольной концентрации. В зависимости от количества испытуемого материала используют одну или несколько чашек на каждое разведение. Параллельно с испытуемым материалом на каждую чашку вносят контрольную концентрацию стандартного антибиотика. После инкубации при 37 °С в течение 16-18 ч измеряют зоны задержки роста тест-микроба, образуемые контрольной концентрацией стандарта и испытуемым раствором. Разность между найденными средними величинами зон испытуемого образца и контрольной концентрации прибавляют к величине зоны контрольной концентрации на стандартной кривой. Затем по кривой находят концентрацию, соответствующую найденной величине зоны в ЕД/мл или мкг/мл.

Умножая полученную концентрацию на степень разведения испытуемого материала, определяют содержание антибиотика в 1 мл испытуемого материала. Точность метода составляет ±10%.

Для выявления концентрации в испытуемом растворе можно использовать таблицы расчета активности антибиотиков. Эти таблицы содержат числовые изображения кривых, имеющих различные углы наклона. Таблицы используют в сочетании со стандартной кривой. Угол наклона каждой кривой характеризуется разностью диаметров зон на стандартной кривой при оценке концентраций, различающихся в 2 раза. Условно принимают, что антибиотик в концентрации 1 мкг/мл образует зону задержки роста диаметром 17 мм.

Чтобы найти таблицу, которая соответствует углу наклона кривой, находят на кривой разность диаметров зон двух концентраций, различающихся в 2 раза. Для определения концентрации испытуемого раствора разность между средними диаметрами зон исследуемого и стандартного препарата прибавляют к 17 мм, если она положительная, и вычитают из 17 мм, если она отрицательная. По полученной величине диаметра зон находят соответствующую концентрацию в таблице. Найденную величину умножают на количество микрограмм, содержащихся в 1 мл контрольной концентрации стандарта. Умножением этой величины на степень разведения находят содержание антибиотика в 1 мл испытуемого раствора (ГФ).

Пример расчета активности 4% раствора гентамицина по полулогарифмической сетке

Используемые величины:

контрольная концентрация гентамицина (К.к.) = 2 ЕД; кривая с концентрацией разведения 1,2; 1,6; 2,0; 2,5; 3,0 ЕД; 1 Е/а (единица активности) = 1 мкг (для данного антибиотика); $D_{max} = (d_5*3 + d_4*2 + d_3 - d_1)/5$,

$D_{min} = (d_1*3 + d_2*2 + d_3 - d_5)/5$

(значения D_{max} и D_{min} нужны для построения калибровочной кри-

вой);

d_3 - среднее значение диаметров зон подавления для К.к.; разведение опытного образца 4% раствора гентамицина до 2 ЕД,

т.е. в 20 000 раз;

активность в ЕД (Х): по графику находим значение, соответствующее величине, равной d_3 + поправка для опытного образца; концентрация в % (А) = Х х разведение опытного образца.

Необходимость применения конкретного метода или операции разделения зависит от начальных свойств культуральной жидкости (вязкости, концентрации продукта, наличия примесей и нежелательных нерастворимых веществ и т.д.), а также от требуемой степени чистоты и конечной формы продукта (кристаллическое вещество, концентрированный раствор, высушенный порошок и т.д.). Неочищенный продукт можно выделить, например, путем простого упаривания культуральной жидкости. Последовательность операций выделения и очистки при получении высокоочищенного целевого продукта выглядит обычно следующим образом.

- Отделение нерастворимых веществ.

Для этой цели обычно используют такие методы, как фильтрование, центрифугирование и/или отстаивание, седиментацию и декантацию.

- Первичное выделение.

Для первичного выделения чаще всего применяют экстракцию растворителями, сорбцию, осаждение и ультрафильтрацию. Последний метод позволяет разделять вещества в соответствии с их молекулярными массами. На стадии первичного выделения значительно возрастает концентрация целевого продукта, причем отделяются в первую очередь вещества, существенно отличающиеся от него по полярности.

- Очистка.

В ходе операции очистки обычно происходит отделение примесей, а также дальнейшее концентрирование продукта. Для этой цели используют фракционное осаждение, различные хроматографические методы и адсорбцию.

- Окончательная очистка продукта.

После этой процедуры (или нескольких процедур) продукт готов к смешению с другими составными частями композиции или к непосредственной отправке потребителю. На этой стадии применяют центрифугирование с последующим высушиванием кристаллического вещества, сушку распылением или в барабане, сушку лиофилизацией (вымораживанием) или отгонку органического растворителя. Типичная последовательность операций выделения и очистки целевого продукта, получаемого биотехнологическим методом, приведена в табл. 4, где указаны как концентрации, так и относительная чистота продукта после каждой операции, в том числе после отделения нерастворимых веществ, первичного выделения, предварительной и окончательной очистки (кристаллизации).

Таблица 4. Последовательность операций выделения и очистки целевого продукта

Операции	Концентрация продукта, г/л	Чистота продукта, %
Исходный бульон	0,1–5,0	0,1–1,0
Фильтрование	0,1–5,0	0,1–2,0
Первичное выделение	5,0–10,0	1,0–10,0
Очистка	50–200	50–80
Кристаллизация	0	90–100

Методы выделения антибиотиков

Экстракционный метод используют для выделения антибиотиков гидрофобной природы.

Для экстракции необходимо наличие двух жидких фаз. При выделении антибиотиков применяют в основном экстракцию органическими растворителями из водной фазы. Для выделения белков были предложены новые двухфазные системы.

Многие антибиотики хорошо растворяются в органических растворителях. Их извлекают из нативного водного раствора экстракцией органическим растворителем, не смешивающимся с водой (хлороформ, этилацетат, бутан), с использованием делительных воронок. В частности, пенициллин (при кислом pH) экстрагируют из подкисленного нативного раствора в хлороформ, а затем реэкстрагируют из хлороформа в щелочную воду. Применение многостадийной экстракции обеспечивает как концентрирование, так и очистку выделяемых веществ, однако при этом требуются большие объемы органических растворителей.

Экстракцию в двухфазных водных системах осуществляют двумя водными фазами, которые образуются при растворении двух несовместимых полимеров, например полиэтиленгликоля (ПЭГ) и декстрана. Образующиеся фазы содержат более 75% воды. Полимерсодержащие фазы можно разделить декантацией (при умеренной

продолжительности отстаивания) или кратковременным центрифугированием. Затем выделяют (к примеру, ультрафильтрацией) необходимый продукт, одновременно регенерируя полимер. Однако не все антибиотики выделяют и очищают экстракцией. Так, стрептомицин выделяют из культуральной жидкости методом ионного обмена.

Сорбция - распределение растворенного вещества между жидкой и твердой фазой (обычно это пористый или обладающий большой поверхностью материал).

Сорбционный метод с использованием поверхностно-активных веществ более рентабелен, так как сорбента требуется около 10% от объема нативного раствора. В качестве сорбентов применяют активированный уголь, полисорбы, ионообменные смолы. Например, стрептомицин сорбируют из нативного раствора на активированный уголь с последующей фильтрацией, десорбируя антибиотик с угля кислым спиртом (стрептомицин как органическое соединение с выраженной полярностью легко сорбируется на угле). Затем анти-

биотик из элюата осаждают раствором сернокислого эфира, получая солянокислую соль стрептомицина. Антибиотики с выраженными основными свойствами (аминогликозиды) легко сорбируются на ионообменные смолы (катиониты) и затем вытесняются водным раствором минеральной кислоты.

Также для выделения антибиотиков, например новобиоцина, можно использовать ионный обмен (в случае непосредственной обработки цельного бульона).

Осаждение. Растворимость органических веществ зависит от температуры, pH, состава, ионной силы и диэлектрической проницаемости растворителя. Осаждение можно индуцировать добавлением осадителя, реагирующего с растворенными веществами и образующего с ними нерастворимое соединение (чаще всего соль). Индуцированное растворителями осаждение применяют в операциях выделения микробных полисахаридов, в том числе декстрана и ксантана. Эти полимеры получают из культуральной жидкости с высокой вязкостью. После добавления хлорида кальция полисахариды осаждают путем разведения бульона метанолом или изопропанолом.

Метод осаждения белков сводится к таким изменениям условий, которые нарушают устойчивость исходной термодинамически стабильной системы (раствора белка) и тем самым приводят к осаждению белка.

Метод осаждения удобен для антибиотиков, которые выделяют из нативного раствора при определенных значениях pH. В частности, грамицидин осаждают в виде дихлоргидрата при подкислении раствора до pH, равном 4,5-5,0. Осадок отфильтровывают и растворяют в 4% спирте. При этом спиртовой раствор является лекарственной формой грамицидина.

Методы анализа

Определение подлинности антибиотиков регламентируется соответствующими фармакопейными статьями.

Качественный анализ

Химические методы. Существуют неспецифические реагенты, дающие цветные реакции с определенными антибиотиками, к примеру ванилин в соляной кислоте (реакция на эритромицин), биуретовая реакция (на грамицидин), окситетрациклин при добавлении концентрированной H_2SO_4 дает пурпурное окрашивание. Левомицетин* дает желтое, переходящее в красно-оранжевое окрашивание при нагре-

вании с NaOH. Стрептомицин при нагревании с раствором NaOH и добавлением железоаммонийных квасцов в H_2SO_4 приобретает фиолетовое окрашивание.

Есть также специфические групповые реагенты, образующие окрашенные соединения с определенными функциональными группами антибиотиков. Так, нингидрин дает желтое окрашивание с аминогруппой антибиотиков аминогликозидной группы, таких, как неомицин, канамицин, гентамицин. Карбоксильную группу в антибиотиках можно обнаружить с помощью индикаторов (например, фузидовая кислота и микофеноловая кислота дают желтое окрашивание с бромфенолом). С помощью таких специфических групповых реагентов можно обнаружить антибиотик также и после хроматографирования его на бумаге или тонком слое силикагеля. Полученные окрашенные зоны укажут на наличие определенной функциональной группы в антибиотике. Однако обнаружение антибиотиков на хроматограммах, как правило, проводят с помощью неспецифических реакций (пары йода, концентрированная H_2SO_4), которые проявляют антибиотик по окрашенным зонам, независимо от структуры вещества. Можно просто выдержать хроматограмму над пламенем горелки и получить коричневые пятна на месте нахождения антибиотиков.

Для обнаружения антибиотиков на хроматограммах очень удобными являются физические методы. Их преимущество заключается в том, что для них требуется малое количество веществ, которые при этом не разрушаются. В качестве примера применения таких методов можно привести визуальный метод обнаружения окрашенных антибиотиков (в частности, антрациклины: рубомицин* - красного цвета, адриамицин* - желтого цвета); тетрациклины обнаруживают на ТСХ по флюоресценции. Антибиотики, имеющие спектр поглощения в ультрафиолетовой (УФ) (200-350 нм) или видимой (350-700 нм) области спектра, можно обнаружить после хроматографии на пластинках силикагеля с добавлением флуоресцентных индикаторов. После хроматографирования на пластинках «Силуфол» (УФ-254) антибиотики обнаруживают в лучах УФ-лампы в виде темных пятен на зеленом флуоресцирующем фоне.

Также антибиотики можно обнаружить на хроматограмме с помощью метода биоавтографии(биологический метод), который заключается в том, что после проведения хроматографического разделения веществ (ТСХ) и удаления паров растворителя пластинку накладывают на газон с тест-микроорганизмом, выдерживают 20-30 мин для диф-

фузии веществ в агар и удаляют пластинку. После инкубации в термостате на месте антибиотиков образуются зоны отсутствия роста тестмикроорганизма. Преимущества

метода биоавтографии в его высокой специфичности, а также малой затрате исследуемого вещества. Однако для проведения данного метода требуется длительное время.

Количественное определение антибиотиков

Количественное определение антибиотиков необходимо в следующих случаях:

• в процессе биосинтеза - для определения оптимального срока ферментации и максимального накопления антибиотика в культуральной жидкости;

• для определения количества действующего начала в субстанции

(по ГФ);

• для определения содержания активного вещества в лекарственной форме (по ГФ).

Преимущество химических методов количественного определения антибиотиков - быстрота проведения анализов. Если антибиотик имеет свободную карбоксильную группу (фузидовая кислота, пенициллановая кислота[р]), ее можно определить прямым алкалиметрическим титрованием щелочью с индикатором. Пенициллин с помощью пенициллиназы освобождает одну карбоксильную группу, что позволяет оттитровать пенициллановую кислоту[р] щелочью с добавлением фенолфталеина. Существует метод косвенного титрования (йодометрия), основанный на поглощении йода продуктами щелочного гидролиза пенициллина, при этом непоглощенный остаток йода оттитровывают раствором тиосульфата натрия. Разница в поглощении тиосульфата исходным антибиотиком и продуктом щелочного гидролиза соответствует количеству пенициллина в образце.

Метод неводного титрования. Большинство фармацевтических препаратов представляют собой слабые кислоты, слабые основания или их соли, и их количественное определение методом кислотноосновного титрования в воде невозможно. Кроме того, вещество может не растворяться в воде. Тогда применяют метод неводного титрования, так как в зависимости от растворителя одно и то же вещество может быть и кислотой, и основанием или вообще не проявлять кислотно-основных свойств. Титрование в неводных растворителях можно вести как с индикатором, так и потенциометрически. Кислотные растворители (уксусная кислота, уксусный ангидрид) используют для титрования веществ, имеющих слабовыраженные

основные свойства. Основные неводные растворители (пиридин, диметилформамид) применяют для титрования веществ со слабовыраженными кислыми свойствами.

К оптическим методам количественного определения антибиотиков относят колориметрию, флуорометрию и спектрофотометрию.

Колориметрический метод основан на измерении интенсивности окраски либо исходного антибиотика (например, антрациклины окрашены в желтый цвет), либо продуктов расщепления антибиотика (стрептомицин).

Флуорометрия основана на определении интенсивности флуоресценции антибиотика по сравнению со стандартом (например, тетрациклины флуоресцируют желтым цветом).

Наиболее часто используют спектрофотометрический метод. Он применим для любых антибиотиков, имеющих максимум поглощения в УФ (200-350 нм) или в видимой области спектра (350-700 нм). С помощью спектрофотометрии измеряют величину поглощения испытуемого антибиотика при определенной длине волны, характерной для данного антибиотика, и сравнивают со стандартом. Так, группа полиеновых антибиотиков имеет характерный спектр поглощения в УФ-области - три максимума, сдвигающиеся к видимой области в зависимости от числа сопряженных связей. Другие антибиотики, например рубомицин* (красного цвета), поглощают в видимой области спектра. Омомицин^{p} относится к гидрофобным антибиотикам, поэтому его выделение возможно путем экстракции из культуральной жидкости этилацетатом, а его количественную оценку в процессе биосинтеза можно провести спектрофотометрически, так как омомицин^{p} имеет максимум поглощения при длинах волн 245 и 291 нм.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяют для количественного определения любых антибиотиков. С помощью этого метода можно разделить изомеры или близкие родственные примеси, определяемые в сумме при биологическом титровании. На спектрограмме исследуемого антибиотика измеряют площадь пика по сравнению со стандартом.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: выработать практическое умение обоснованно выбирать и практически применять определенный метод анализа антибиотиков.

К занятию необходимо знать:

- принципы выделения антибиотиков из культуральной жидкости;
- разновидности методов выделения, условия выделения;
- аппаратурное оформление;
- методы определения подлинности антибиотиков;
- методы количественного анализа антибиотиков. К занятию необходимо уметь:
- выбирать метод определения антибиотика в культуральной жидкости в соответствии с его свойствами;
- проводить экстракцию антибиотика;
- проводить сорбцию антибиотика на активированном угле;

- проводить осаждение антибиотика из культуральной жидкости;
- проводить хроматографическое разделение и обнаружение антибиотиков;
- делать точную навеску на аналитических весах;
- проводить кислотно-основное титрование;
- рассчитывать количественное содержание антибиотика в культуральной жидкости.

Контрольные вопросы

- Назовите последовательность операций выделения и очистки

БАВ.

- Как можно классифицировать омомицин^{р}, галтамицин^{р} и фузидовую кислоту?
- Приведите методы выделения антибиотиков из культуральной жидкости.
- Какие методы определения подлинности антибиотиков вам известны?
- Как идентифицируются омомицин^{р}, галтамицин^{р}, фузидовая кислота в экстрактах культуральной жидкости?

Укажите, что может содержать культуральная среда (жидкость) помимо целевого продукта?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Антибиотики».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. - М.: Наука, 2004.

Лабораторная работа ? 4 Качественное определение антибиотиков омомицина^{р} и галтамицина^{р} в экстрактах культуральной жидкости с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках силуфолаЦель работы: научиться определять антибиотики в экстрактах культуральной жидкости с помощью ТСХ на пластинках силуфола на примере омомицина^{р} и галтамицина^{р}.

Целевые задачи

- проведение хроматографического разделения экстракта культуральной жидкости на пластинке силуфола (УФ-254) в системе растворителей «петролейный эфир-ацетон» (2:1);
- обнаружение антибиотиков.

Материальное обеспечение работы

Реактивы:

- петролейный эфир;
- ацетон;
- пластинки «Силуфол», УФ-254. *Приборы:*
- камеры хроматографические;
- микропипетки;
- пинцеты;
- фен;
- газовая горелка;
- УФ-лампа;
- цилиндры 5 и 10 мл.

Суть работы

Определение основано на сорбции ЛС на силикагеле в соответствии с коэффициентами распределения в двухфазной системе растворителей.

Методика

Хроматографическое разделение экстракта культуральной жидкости проводят на пластинке силикагеля «Силуфол» (УФ-254) в системе растворителей: петролейный эфир-ацетон (2:1). На стартовую черту пластинки нужно нанести микропипеткой каплю этилацетатного экстракта. Высушить струей воздуха и прогнать пластинку в указанной выше системе растворителей. Пластинку высушить и отдуть растворители до исчезновения запаха.

Визуально обнаруживается менее подвижное пятно красного цвета (антибиотик антрациклиновой группы галтамицин^{р}).

Омомицин^{р} (бесцветный) визуально не обнаруживается. Его можно визуализировать в свете УФ-лампы по поглощению в виде фиолетового пятна на зеленом фоне или при прогревании над пламенем горелки (сгорают все органические соединения, и омомицин^{р} обнаруживается в виде коричневых зон).

Лабораторная работа ? 5 Качественное и количественное определение фузидовой кислоты

Фузидовая кислота (фузидин*) - противомикробное средство, применяемое при пневмониях, отитах, остеомиелите. Образуется продуцентом *Fusidium coccineum.* Это антибиотик стероидной структуры. Количественное определение фузидовой кислоты в субстанции можно провести как прямым алкалиметрическим титрованием, так и методом

потенциометрического титрования. Антимикробную активность фузидовой кислоты можно определить биологическим методом диффузии в агар со стандартной микробной тест-культурой.

Цель работы: научиться применять аналитические методы качественного и количественного определения фузидовой кислоты в условиях биотехнологического производства антибиотиков.

Целевые задачи

- установление подлинности фузидовой кислоты;
- проведение прямого титрования фузидовой кислоты кислотноосновным методом;
- определение количественного содержания фузидовой кислоты в образце, полученном с биотехнологического производства (например, в культуральной жидкости).

Материальное обеспечение работы

Реактивы:

- раствор щелочи (0,1 н NaOH);
- фузидовая кислота;
- пропиловый спирт;
- фенолфталеин, 1% раствор. *Приборы:*
- установка для титрования;
- аналитические весы.

Прочие материалы:

- фильтровальная бумага;
- горелка;
- колбы для титрования;
- цилиндры;
- капельница с раствором фенолфталеина. Суть работы

Проведение качественного и количественного анализа антибиотика фузидовой кислоты на основе ТСХ и кислотно-основного титрования; определение подлинности фузидовой кислоты.

Качественный анализ фузидовой кислоты

На пластинку силикагеля «Силуфол» наносят каплю спиртового раствора фузидовой кислоты, высушивают феном и хроматографируют в системе растворителей (петролейный эфир-ацетон, 2:1). Пластинку высушивают и просматривают в лучах УФ-лампы (254 нм): фузидовая кислота обнаруживается в виде фиолетового пятна на зеленом флуоресцирующем фоне.

Хроматограмму (ТСХ) выдерживают в парах йода: фузидовая кислота обнаруживается в виде коричневого пятна, которое можно закрепить (чтобы не выцвело), опрыснув слабым (0,01%) водным раствором $KMnO_4$. Пятно становится фиолетовым и со временем не исчезает.

ТСХ с фузидовой кислотой также можно опрыснуть насыщенным раствором $KMnO_4$. На месте фузидовой кислоты образуется яркожелтое пятно на розовом фоне, которое при прогревании ТСХ над пламенем становится коричневым.

Количественное определение фузидовой кислоты

Точную навеску (0,25-0,5 г) растворяют в 5 мл пропилового спирта. Проводят прямое титрование с индикатором фенолфталеином, 0,1 моль/л раствором щелочи (NaOH) до светло-розового окрашивания (окончание титрования).

Расчет проводят, используя титриметрический фактор пересчета, по средним показателям объема титранта из 3 титрований (1 мл 0,1 моль/л NaOH соответствует 0,05167 г фузидовой кислоты).

Результаты работы оформляют в протоколе.

Контрольные вопросы

• Укажите, где может происходить локализация целевого продукта при биосинтезе антибиотиков?

• Какие методы отделения биомассы существуют?

• От чего зависит выбор метода выделения антибиотика?

• Какие неспецифические и специфические групповые реагенты можно предложить для идентификации антибиотиков?

• Как различить омомицин^{р} в присутствии галтамицина^{р}? Как идентифицируется фузидовая кислота?

Какая система растворителей используется в задаче?

• Какова структура фузидовой кислоты и каковы ее антибиотические свойства?

• Как можно получить фузидовую кислоту и как определить степень чистоты препарата с количественной оценкой в условиях биотехнологического производства?

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ РОСТА ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ БИОСИНТЕЗА

Введение

Тот факт, что в компетенции специалиста-провизора находятся вопросы безопасности и качества выпускаемой биотехнологической продукции, не подлежит сомнению. Это требует от него умения правильно оценить как эффективность производства, так и его рентабельность.

В настоящее время одной из самых обширных и востребованных групп лекарственных ЛС являются антибиотики, продуцентами которых служат микроорганизмы, и от максимального использования потенциала последних зависит успех биотехнологического производства в целом.

Данная тема практического занятия, относящаяся к изучению морфологии микроорганизмов-продуцентов БАВ в различные фазы роста при глубинном культивировании и выбору оптимальных пара-

метров биосинтеза, соответствует одной из основных технологических функций провизора в обучении навыкам и умению производить оценку биосинтеза и в случае необходимости предлагать корректировку процесса.

Краткие теоретические основы биосинтеза антибиотиков

Продуцент как саморегулируемая система

В ходе развития микроорганизмов их клетки непрерывно претерпевают как количественные, так и качественные изменения: рост, изменение химического состава, морфологического состояния, размножение, спорообразование, гибель. Интенсивность процесса в клетке микроорганизма зависит от того, в каких условиях она находится. При изучении влияния внешних факторов на развитие продуцента следует помнить, что клетка - сложная саморегулируемая система. Например, при росте на полноценной питательной среде дрожжи интенсивно размножаются, а после исчерпания источника азота рост останавливается, но идет сверхсинтез липидов. Приспосабливаясь к новым условиям, бактерии изменяют направления метаболизма, что обнаруживается по самым разнообразным признакам. Так, при обеднении среды питательными веществами многие бактерии изменяют форму, увеличивая поверхность контакта со средой для облегчения транспорта субстратов. При росте на полноценной среде возрастает количество рибонуклеиновой кислоты (РНК) и рибосом в клетках, изменяется содержание внутриклеточного белка, ДНК и других компонентов. Количество выделяемых в среду метаболитов (антибиотиков, аминокислот, ферментов) может повышаться в сотни раз. Способность культуры к саморегуляции и связанные с ней явления используют в биотехнологии для направленного воздействия на микроорганизмы с целью получения

больших количеств продуктов метаболизма. К примеру, интенсивный биосинтез тетрациклиновых антибиотиков в периодической культуре начинается лишь после исчерпания в культуральной жидкости неорганического фосфата; при получении β-лактамных антибиотиков важно поддерживать аэрацию процесса на уровне 30% от насыщения.

Обобщенная технологическая схема процесса микробного синтеза

Технологические процессы, основанные на микробном синтезе, можно представить в виде определенной последовательности стадий, большинство из которых являются общими для любого микро-

биологического производства: приготовление посевного материала; приготовление и стерилизация питательной среды; ферментация; выделение целевого продукта и получение его лекарственной формы. Кроме того, эти процессы включают ряд вспомогательных операций: стерилизацию оборудования и коммуникаций, приготовление и стерилизацию пеногасителей, растворов и др. (рис. 1).

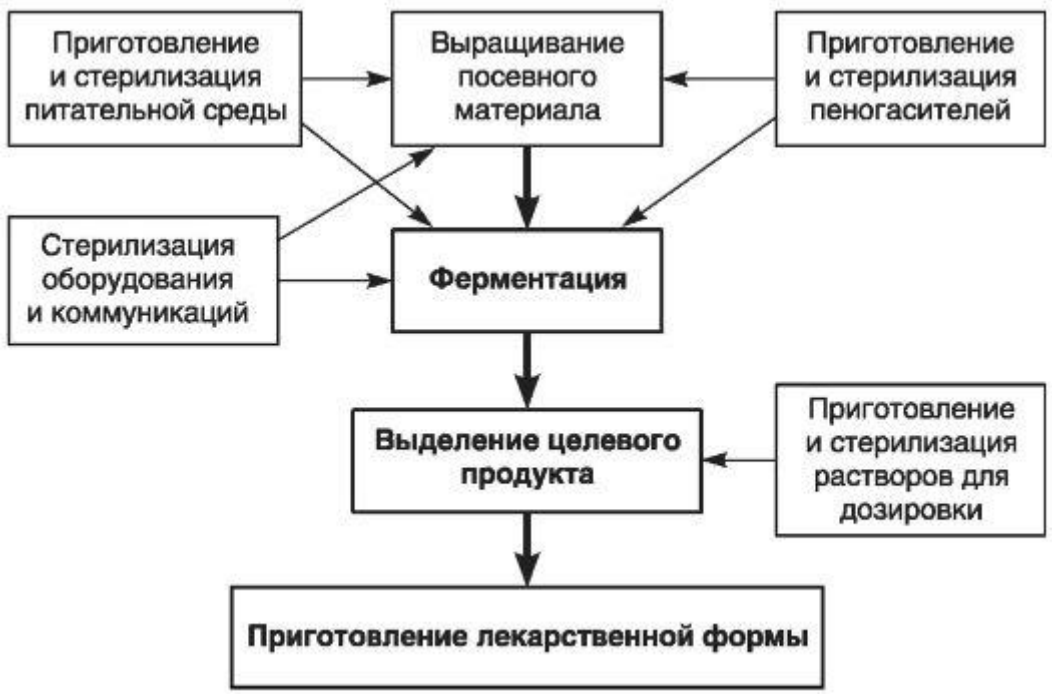


Рис. 1. Схема типового микробиологического производства

Посевной материал

Накопление биомассы и биосинтез продуцентов БАВ в промышленных условиях осуществляются методом глубинного культивирования. Успешность процесса биосинтеза антибиотиков и других БАВ в значительной степени зависит от качества посевного материала, питательной среды и подбора оптимальных условий биосинтеза.

При подготовке посевного материала, используемого в процессе ферментации, необходимо учитывать объем и возраст культуры. Показателями для определения качества посевного материала и возраста культуры служат количество биомассы и

цитохимические данные. Для определения количества биомассы используют: оптическое методы, основанные на измерении светорассеивания культуральной жидкости - мутности (для питательных сред, не содержащих осад-

ка, и для культур продуцентов, не образующих мицелий); весовой метод - высушивание биомассы до постоянного веса и др. В производстве зачастую прибегают к экспресс-методу - определению влажности биомассы, т.е. отношению осадка биомассы к общему объему культуральной жидкости. На основе полученных данных строят кривую роста продуцента и определяют фазы его развития (лаг-фаза или фаза адаптации продуцента, экспоненциальная фаза роста, стационарная фаза, фаза отмирания или автолиза культуры). С учетом характера роста продуцента делают вывод о времени остановки ферментации или передачи посевного вегетативного материала на следующую стадию в нужный момент (например, вегетативный посевной материал, как правило, переносят на стадию биосинтеза в середине экспоненциальной фазы роста). Скорость роста продуцента в разных условиях - важный показатель оптимальности процесса.

Приготовление вегетативного посевного материала осуществляют посредством высева продуцента с газона агаризованной среды в жидкую питательную среду в колбы. Культивирование проводят при разработанных для каждого продуцента условиях (питательная среда, температура, перемешивание, аэрация). Оптимальное количество инокулята (вегетативного посевного материала для проведения культивирования) составляет 5-10% от объема питательной среды. Такая доза посевной биомассы позволяет сократить лаг-фазу при пересеве в ферментационную среду. Возраст продуцента также имеет большое значение для успешного осуществления биосинтеза. Как правило, это середина фазы экспоненциального роста или начало стационарной фазы. К этому времени клетки микроорганизма активно делятся и не накапливают токсичных продуктов метаболизма. Для накопления биомассы проводят ряд ферментаций, начиная с колб в лабораторных условиях, с последующим последовательным пересевом несколькими этапами в аппараты большей емкости (10, 100, 1000 л и т.д.). Как уже было сказано выше, для определения качества полученного посевного материала при передаче в аппарат для биосинтеза проводят микроскопию окрашенного мазка и измерение количества накопленной биомассы.

Ферментация, стадии роста и биосинтеза

В середине 30-х годов прошлого столетия академик В.Н. Шапошников выдвинул теорию двухфазности биосинтеза антибиотиков. Первая фаза (фаза роста - трофофаза) характеризуется быстрым ростом культуры, интенсивным синтезом нуклеиновых кислот и белков; синтеза антибиотиков в этой фазе не происходит. Вторая фаза (фаза

биосинтеза - идиофаза) отличается снижением скорости роста культуры и интенсивным синтезом антибиотиков.

Цитоморфологическая картина развития мицелия в 1-й и 2-й фазах также различна: в первой фазе молодой мицелий тонкий, растущий, который характеризуется гомогенной базофильной (хорошо прокрашенной) протоплазмой; «вторичный» мицелий утолщается,

наблюдают дифференциацию содержащего базофильные фрагменты ядерного вещества протоплазмы при общем снижении базофилии.

Особенностью вторичных метаболитов, которая имеет большое значение для понимания регуляторных механизмов биосинтеза, является их образование в условиях, когда скорость роста продуцента снижена (т.е. для того, чтобы культура продуцента начала синтезировать, например, антибиотик, необходимо лимитировать ее рост). Фактор, который контролирует начало биосинтеза антибиотика, - это, как правило, дефицит компонентов питательной среды. Их исчерпание тормозит рост культуры и инициирует биосинтез антибиотика. При этом поток первичных метаболитов (аминокислоты, органические кислоты, сахара и др.), использующихся в период интенсивного роста культурами на построение основных клеточных структур, переключается на синтез вторичных метаболитов, в частности антибиотиков.

Известно, что к факторам, влияющим на биосинтез антибиотиков, относят:

- состав среды;
- значение pH;
- окислительно-восстановительный потенциал;
- условия аэрации и перемешивания;
- температурный режим;
- параметры оборудования (диаметр и высота ферментера, вид и размер мешалки, барбатера и т.д.).

Помимо вышеуказанных, существуют также индивидуальные параметры для каждого процесса биосинтеза. Например, вводят индукторы или предшественники биосинтеза. Часто применяют подпитку одним из компонентов питательной среды на протяжении отдельных стадий или всего процесса. Важным условием успешного проведения биосинтеза является выбор пеногасителя, который не ингибирует рост и биосинтез продуцента, а иногда, напротив, стимулирует биосинтез. В процессе ферментации на комплексных питательных средах, содержащих гороховую и соевую муку или другие органические компоненты, происходит образование пены, что

может привести как к ухудшению аэрации, так и к контаминации питательной среды. В этом случае дозированно вводят природные (кашалотовый жир) или синтетические (лапрол, пропенол, полиметилсилоксан и др.) пеногасители.

Состав среды и условия ферментации

Большое значение для успешного накопления целевого продукта и роста микроорганизма имеют также состав среды и условия выращивания. Состав ферментационной среды определяется физиологическими особенностями продуцента. При выборе компонентов питательной среды следует учитывать, что продуценты антибиотиков относятся к

хемоорганотрофным микроорганизмам, соответственно, они нуждаются в органических субстратах в качестве доноров электронов и источника углерода. В лабораторных условиях проводят выбор компонентов и расчет оптимальных концентраций с использованием математических методов планирования эксперимента.

В фазе роста (трофофазе - 1-я фаза) все компоненты среды должны содержаться в количествах, обеспечивающих высокую скорость роста, т.е., с известным избытком. При переходе процесса в идиофазу (2-я фаза) концентрация основных компонентов питательной среды (углеводов, азота, фосфора) значительно ниже, чем в фазе роста. Однако обязательным условием является наличие минимума веществ, из которых строится молекула антибиотика и которые обеспечивают этот процесс энергией. Решающий параметр для перехода процесса из 1-й во 2-ю фазу и создания условий для максимальной скорости биосинтеза антибиотика - соотношение компонентов в исходной среде. В некоторых случаях в благоприятных для биосинтеза антибиотика условиях его количество пропорционально количеству выросшего мицелия. Однако, как правило, этот процесс не является оптимальным и требует либо работы с продуцентом по повышению его активности, либо дополнительных исследований по оптимизации процесса биосинтеза.

Для создания способа регулируемой ферментации необходимы определение диапазона лимитирования роста продуцента и биосинтеза антибиотика различными субстратами, соблюдение параметров регуляции процесса биосинтеза, определение оптимальных регулирующих концентраций субстратов и т.д.

С этой целью проводят как ряд экспериментальных ферментаций, так и сравнительный анализ зависимости продуктивности культуры при различных параметрах ведения процесса. В ходе процесса фер-

ментации периодически отбирают пробы культуральной жидкости и определяют:

- количество биомассы продуцента;
- содержание в среде аминного и аммонийного азота методами биохимического анализа или с помощью измерительных датчиков;
- количество углеводов (общих и глюкозы) методами биохимического анализа;
- pH среды - потенциометрическим методом;
- количество растворенного кислорода с помощью датчика pO_2 или методами биохимического анализа;
- количество образовавшегося продукта биосинтеза.

Процесс ферментации ведут до тех пор, пока не прекращается интенсивный синтез целевого продукта и пока в среде не будут полностью исчерпаны питательные вещества. При определении окончания ферментации необходимо учитывать также данные микроскопического контроля состояния культуры.

Управляемые процессы ферментации

Первый тип управляемых ферментационных процессов - периодические процессы без добавления питательных веществ в ходе культивирования, но с регулированием некоторых физико-химических параметров, таких, как температура, pH, режим аэрации (перемешивание и количество подаваемого в аппарат воздуха). В качестве примера можно привести процесс биосинтеза эритромицина, при котором температура и pH изменяются по заданным профилям, найденным с помощью математических моделей. Поддержание оптимальных профилей этих параметров существенно повышает производительность процесса, при этом время, необходимое для накопления того же количества эритромицина, что и в контроле (при постоянных температуре и pH), сокращается с 300 до 200 ч.

Второй тип управляемых ферментационных процессов - полупериодические процессы или процессы с добавлением питательных веществ в ходе культивирования. Необходимость в добавлении субстратов по ходу ферментации обычно возникает, когда высокая концентрация субстрата ингибирует рост культуры или биосинтез целевого метаболита. В этом случае нужно выбрать оптимальную концентрацию субстрата в исходной среде и режим его добавления в аппарат. Нужно знать зависимость скорости роста биомассы и накопления целевого продукта от концентрации субстрата в культу-

ральной жидкости или хотя бы концентрации субстрата, при которых рост культуры и биосинтез продукта максимальны.

В качестве примера таких процессов можно привести биосинтез тетрациклина с добавлением глюкозы, сульфата аммония и кукурузного экстракта. В предварительных экспериментах были установлены концентрации этих субстратов, оптимальные для роста культуры продуцента и для биосинтеза антибиотика. Подобранный состав исходной среды обеспечил быстрый рост биомассы в первой фазе и ранний переход к фазе интенсивного синтеза тетрациклина. Режим дозирования питательных веществ во 2-й фазе обеспечил поддержание концентрации глюкозы на уровне 10-20 мг/мл, аммонийного азота - 0,4- 0,8 мг мл и неорганического фосфора - 25-30 мкг/мл. Эксперименты, проведенные в лабораторных условиях (в колбах на качалке), показали возможность повышения количества антибиотика к концу ферментации в 5-7 раз по сравнению с нерегулируемым процессом при уменьшении продолжительности ферментации в 2-2,5 раза.

В процессе биосинтеза пенициллина на глюкозной среде накопление антибиотика при единовременной загрузке большого количества глюкозы в питательную среду ничтожно мало вследствие эффекта катаболитной репрессии. При непрерывном добавлении глюкозы в ходе ферментации биосинтез пенициллина идет интенсивно, причем степень интенсификации биосинтеза зависит от того, насколько близок к оптимальному выбранный режим дозирования субстрата.

В ходе дозированной подачи питательных субстратов скорость подачи компонента зависит от текущих значений параметров (pH, pO_2 и др).

Задачи, связанные с подбором оптимальных профилей изменения управляющих переменных и дозированием питательных веществ, ставят обычно для процессов, при которых возможности интенсификации за счет простых воздействий исчерпаны.

Задание для самоподготовки

Цели изучения темы занятия:

• научиться оперировать понятиями: культура продуцента, культуральная жидкость, критерии биосинтеза, оптимальный биосинтез;

• научиться анализировать ферментационные процессы при получении БАВ и обоснованно выбирать оптимальные параметры биосинтеза.

К занятию необходимо знать:

• особенности морфологии основных групп продуцентов БАВ;

• требования к микроорганизмам-продуцентам и условиям поддержания их продуктивности;

• отличия первичных и вторичных метаболитов микроорганизмов;

• основы технологии биосинтеза БАВ. К занятию необходимо уметь:

• проводить цитоморфологический анализ культур микроорганизмов при окраске метиленовой синью;

• идентифицировать продуценты по морфологическим характеристикам (макро- и микроморфологические признаки);

• работать со стеклянной пипеткой при отборе культуральной жидкости из колбы;

• проводить центрифугирование.

Контрольные вопросы

• В чем заключаются морфологические отличия продуцентов БАВ на разных стадиях развития?

• Назовите отличия первичных и вторичных метаболитов микроорганизмов.

• Перечислите стадии промышленного процесса получения БАВ.

• Укажите основные параметры оптимизации биосинтеза БАВ.

Литература

Обязательная

1. *Шлегель Г.* Общая микробиология. - М.: Мир, 1987.

2. Лекции по теме «Биосинтез вторичных метаболитов».

3. Настоящее учебное пособие. Дополнительная

1. *Бейли Дж., Оллис Д.* Основы биохимической инженерии. - М.:

Мир, 1989.

2. Метаболизм микроорганизмов. Практикум / под ред. Н.С. Егорова. - Московский университет, 1986.

3. *Кантере В.М.* Теоретические основы технологии микробиологических производств. - М.: Агропромиздат, 1990.

Лабораторная работа ? 6 Изучение микроморфологических особенностей продуцентов биологически активных веществ (на примере продуцента омомицина[р] *Streptomyces chromopurpureos)* на разных стадиях культивирования (трофофаза, идиофаза) с выбором оптимальных условий

процесса биосинтеза антибиотика Цель работы: научиться определять стадии роста и биосинтеза продуцента, т.е. определять трофофазу и идиофазу методом микроскопирования окрашенного мазка культуральной жидкости.

Целевые задачи

• идентифицировать микроморфологические признаки продуцента в стадии роста (трофофаза) после окраски метиленовой синью;

• идентифицировать признаки продуцента в стадии биосинтеза (идиофаза);

• сравнить микроскопию двух фаз - интенсивность окраски, вид и размер клетки, наличие внутриклеточных включений, дифференциацию протоплазмы, образование спор;

• измерить объемную биомассу на разных стадиях культивирования продуцента и построить кривую роста.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• культуральная жидкость продуцента омомицина[р];

• метиленовая синь;

• предметные стекла;

• пипетки стеклянные;

• фильтровальная бумага;

• пробирки мерные. *Приборы:*

- микроскоп;
- осветитель к микроскопу;
- центрифуга;
- газовая горелка.

Суть работы

Исследовать динамику кривой роста продуцента с определением стадий процесса биосинтеза и сравнительной характеристикой цитохимических признаков продуцента в трофофазе и идиофазе.

Порядок выполнения работы

- Отбирают пробы культуральной жидкости из колбы при ее одновременном перемешивании, что позволяет отобрать среднюю пробу.
- Переносят отобранную культуральную жидкость в мерную пробирку до отметки 10 мл.
- Уравновешивают пробирки с отобранными пробами на весах.
- Центрифугируют пробирки с отобранными пробами культуральной жидкости при 2000 об/мин в течение 10 мин. Пробирки извлекают из центрифуги только после окончательной остановки ротора.
- Определяют процентное содержание биомассы относительно всего содержимого пробирки (в начальной стадии возможно неполное исчерпание питательной среды и как результат присутствие в осадке нерастворимых компонентов среды вместе с биомассой). Отличить биомассу от компонентов среды помогает преподаватель.
- На основе полученных данных строят график; по оси абсцисс указывается время взятия пробы, по оси ординат - количество образовавшейся биомассы.
- Из колб с культуральной жидкостью с пометкой «48 ч роста» и «168 ч» роста отбирают пипеткой пробы, переносят на предметные стекла и растирают по их поверхности.
- Пробу культуральной жидкости на стекле сушат на воздухе или в пламени горелки так, чтобы стекло не перегревалось. Перегрев культуральной жидкости приведет к деформации клеток продуцента и нарушит цитологическую картину при микроскопировании.
- Высохшую пробу культуральной жидкости на стекле фиксируют в пламени горелки, направляя стекло в пламя со стороны нанесенной пробы. Проводят трижды стекло через пламя медленными движениями, после чего стекло остужают при комнатной температуре.
- Остуженное предметное стекло с нанесенной пробой помещают на специальную полочку над кристаллизатором и окрашивают метиленовой синью, нанося краситель на всю поверхность мазка и выдержав 30-60 с. По окончании окраски излишек красителя

сливают на фильтровальную бумагу и промывают стекло под тонкой струей воды, при этом проба на стекле должна быть расположена с обратной стороны от струи воды и омываться лишь стекающими каплями. Промывку осуществляют до обесцвечивания стекающей воды, после чего излишки воды промокают фильтровальной бумагой, устанавливая стекло ребром. Сушат стекла на воздухе или в пламени горелки, не допуская перегревания.

• Проводят микроскопию окрашенного мазка.

• Полученные данные фиксируют в рабочем журнале; микроскопию зарисовывают и описывают; на графике роста культуры в процессе ферментации обозначают стадии культивирования. По данным микроскопии указывают трофофазу и идиофазу.

Лабораторная работа ? 7 Определение оптимальных параметров ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина*

Цель работы: научиться анализировать параметры процесса биосинтеза БАВ и определять оптимальные параметры для биосинтеза антибиотиков и других БАВ.

Целевые задачи

• изучить представленные в виде таблицы параметры двух процессов синтеза рубомицина* и представить данные в виде графика;

• охарактеризовать эти процессы и выбрать из них оптимальный (время начала биосинтеза, какими изменениями сопровождается процесс биосинтеза рубомицина♠).

При описании процесса руководствоваться предложенной в примечании схемой изложения и дополнить собственными выводами.

Ферментация ? 1 (аппарат «Chemap 1»)

• Состав среды, %:

• крахмал картофельный - 6,5;

• соевая мука - 1,7;

• глюкоза - 1,5;

• $(NH_4)_2SO_4$ - 0,4;

• K_2HPO_4 - 0,01;

• $CaCO_3$ - 0,5;

• pH (перед посевом) 7,1.

Таблица 5. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemap 1» с использованием крахмальной среды

№ пробы	Часы роста	Биомасса, %	pH	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	pO_2, %	Активность, мкг/мл
1	0	–	7,1	6,55	1,56	86,8	65	50
2	11	5	6,9	6,22	1,56	86,8	60	175
3	35	10	6,9	5,98	–	84,0	57	277
4	59	38	6,5	5,36	–	81,2	52	306,6
5	83	32	7,0	4,31	–	53,2	43	297,3
6	107	30	8,2	4,31	–	89,6	43	146

Ферментация ? 2 (аппарат «Chemap 2») Состав среды, %:

- гороховая мука - 3;
- сахароза - 7;
- NaCl - 0,4;
- KCL - 0,04;
- K_2HPO_4 - 0,08;
- (NH4)2SO4 - 0,4;
- $CaCO_3$ - 0,8;
- pH (перед посевом) 7,41.

Таблица 6. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemap 2» с использованием сахарозно-гороховой муки

№ пробы	Часы роста	Биомасса, %	pH	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	pO_2, %	Активность, мкг/мл
1	0	–	7,15	5,57	0,88	114,8	65	50,7
2	11	5	7,07	5,54	–	112	30	160,6
3	35	25	6,7	4,0	–	81,2	22	335,8
4	59	25	6,75	3,41	–	28	20	552,8
5	83	25	6,75	2,32	–	8,4	20	685,8
6	107	25	6,6	0,9	–	1,02	25	823

Порядок выполнения работы

- Используя приведенные данные, построить кривые изменения для каждого параметра; по оси ординат начертить индивидуальную шкалу.

Для каждого процесса ферментации построить отдельный график.

- Зависимость накопления антибиотика от изменения параметров описывают для каждого процесса после выполнения графического рисунка.

- Для двух процессов сделать обобщающий вывод оптимальных изменений, ведущих к выходу максимального количества антибиотика.

Примечание

При характеристике процессов использовать:

• продолжительность лаг-фазы ... ч, в этот период (не) наблюдается ... ;

• прирост биомассы максимальный на ... ч роста, фаза роста (трофофаза продолжается до ... ч от начала процесса и характеризуется значением pH - азота - углеводов - интенсивность дыхания - ...);

• начало синтеза антибиотика совпадает со снижением

• биомасса на ... ч, торможение прироста биомассы совпадает с

• максимальная скорость биосинтеза совпадает с ...

При выборе оптимального процесса обратить внимание на:

• исчерпание компонентов среды с учетом скорости потребления;

• зависимость биомассы от активности (удельная активность) продуцента;

• влияние параметров на окончание процесса;

• возможность продления процесса для увеличения выхода антибиотика при применении подпитки (каким компонентом среды и предположительно какую концентрацию следует поддерживать на протяжении процесса с учетом представленных данных).

Контрольные вопросы

• Какие основные параметры регулируют при оптимизации биосинтеза продуцентов БАВ?

• Какое значение имеет питательная среда для биосинтеза продуцента?

• Как изменяется состав среды в начале биосинтеза?

• Как влияет продление времени ферментации на накопление БАВ продуцентом?

• Каким образом подбирают состав среды и чем руководствуются при выборе компонентов среды?

• Как можно повысить продуктивность (конечный выход целевого продукта) биосинтеза?

• Какие свойства биообъекта могут совершенствоваться при получении промышленных штаммов?

• Каковы условия безопасности работы с продуцентами?

• На какие стадии разделяют развитие культуры продуцента в течение всего процесса культивирования?

- Какие две стадии развития продуцента существует? Как отличаются цитоморфологически клетки продуцента на этих стадиях?
- Как определить качество посевного материала?

ГЛАВА 2 АМИНОКИСЛОТЫ

Тема «Аминокислоты» посвящена методам культивирования плазмидных штаммов-продуцентов аминокислот. Представленный материал включает: приготовление питательных сред и добавок; подготовку ферментера к работе; засев инокулятора и выращивание в нем посевного материала; засев ферментационной среды посевным материалом; процесс ферментации треонина в ферментере в условиях интенсивной аэрации и pH-статирования при дробной подаче в среду источников углерода и азота по сигналу от датчика pH; методы контроля процесса ферментации.

Цели изучения темы: ознакомление с процессом культивирования плазмидных штаммов-продуцентов аминокислот на примере штамма *Escherichia coli* - продуцента треонина и освоение методов контроля процесса ферментации (ТСХ аминокислот).

Данная тема представлена одним семинарским занятием, включающим краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ.

На занятии выполняют лабораторную работу, состоящую из двух частей: «Ферментация треонина; идентификация и определение содержания этой аминокислоты в культуральной жидкости».

Для лабораторной работы приведены: цель и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие построено по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита результатов работы.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* - ПРОДУЦЕНТА ТРЕОНИНА

Введение

Аминокислоты широко применяют в медицине для лечения послеоперационных больных, при лечении заболеваний ЦНС, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, печени. Также целесообразно по медицинским показаниям добавлять незаменимые аминокислоты в продукты питания.

Природные аминокислоты являются, как правило, оптически активными L-формами, тогда как аминокислоты, получаемые химическим синтезом, это рацемические смеси L- и D-форм, которые трудно разделить. Именно поэтому в настоящее время микробный синтез предпочтителен и экономически более выгоден.

Специфические ферменты, регулирующие биосинтез аминокислот, широко распространены у бактерий, однако детально они изучены лишь у некоторых из них, в частности у *Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Bacillus subtilis* и др. У грибов в

ответ на аминокислотное лимитирование отмечают некоординированное параллельное возрастание уровня ферментов, катализирующих реакции биосинтеза различных аминокислот. В гиперпродукции отдельных аминокислот модифицированными культурами *E. coli, Serratia marcescens* и др. важную роль играют различные уровни механизмов внутриклеточной регуляции метаболизма, такие, как ретроингибирование и согласованная репрессия (например, при биосинтезе ароматических аминокислот на последних стадиях).

Штаммы-суперпродуценты, используемые в производстве, чаще всего получены с применением методов генетики и селекции. При помощи штаммов-суперпродуцентов из родов *Brevibacterium, Corynebacterium, Mycrococcus* и др. налажено крупнотоннажное производство не только глутамата, но и треонина, лизина, валина, гистидина и других аминокислот. При суперпродукции уровень экспрессии клонированного гена выражается в синтезе специфического белка в количестве не менее 2% от всех растворимых белков клетки-хозяина. В настоящее время существуют суперпродуценты, у которых количество синтезируемого специфического белка достигает 10-50% (здесь важнейшую роль играют многокопийные плазмиды, несущие встроенные

гены). Так, генно-инженерными методами во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) был получен штамм *E. coli,* обладающий сверхпродукцией L-треонина (свыше 100 г/л за 40 ч ферментации). Технология получения аминокислот базируется на принципах ферментации продуцентов и выделения вторичных метаболитов, т.е. вначале маточную культуру размножают на агаризованной среде в пробирках, затем на жидкой среде в колбах, инокуляторах и посевных аппаратах, а после этого в головных (основных) ферментерах. Изолированные чистые кристаллы целевого продукта обычно высушивают под вакуумом и упаковывают. Периодические ферментации используют при получении различных L-аминокислот (глутаминовой, фенилаланина, лизина, триптофана и др.). При этом обычно культивируют специальные мутантные штаммы, метаболизм которых по целевому продукту изучен достаточно полно. Так, например, установлено, что лимитирующим агентом коринебактерий, образующих глутаминовую кислоту, является биотин (витамин B_7, витамин Н) в дозе 1-5 мкг/л. Биотин индуцирует структурно-функциональные изменения в клеточной мембране, благодаря чему увеличивается ее проницаемость для глутаминовой кислоты, выходящей из клетки в культуральную жидкость. Отдельные штаммы продуцентов способны на мелассных средах накапливать более 50 г/л глутаминовой кислоты. Роль биотина аналогична также в случае получения L-пролина, являющегося производным L-глутаминовой кислоты. Крайне перспективными считают способы получения аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов и клеток. В промышленности давно апробирован и налажен процесс получения L-аспарагиновой кислоты из фумаровой и аммиака в одну стадию с помощью иммобилизованных клеток *E. coИ* или *Pseudomonas aeruginosa,* обладающих аспартазной активностью. Аспартаза катализирует реакцию присоединения аммиака к фумаровой кислоте. Фермент в иммобилизованном состоянии сохраняет активность на исходном уровне до 2-2,5 нед и более.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: ознакомление с биотехнологическими методами получения чистых L-аминокислот (метод прямого микробиологического синтеза треонина).

К занятию необходимо знать:

• общие теоретические основы создания штаммов-суперпродуцентов аминокислот;

• характеристики и особенности ферментационных сред для культивирования штаммов-суперпродуцентов аминокислот;

• методы культивирования штаммов-суперпродуцентов аминокислот.

К занятию необходимо уметь:

• определять pH и оптическую плотность в отобранных из ферментера пробах;

• делать высевы культуры из ферментера микробиологической петлей на чашки с питательным агаром для контроля чистоты культуры;

• определять концентрацию треонина в ферментационных пробах методом ТСХ.

Контрольные вопросы

• Назовите методы получения аминокислот и укажите их специфические особенности и различия.

• Какие микроорганизмы используют для микробиологического синтеза аминокислот?

• Перечислите лекарственные препараты, содержащие чистые аминокислоты.

• На какие уровни регуляции внутриклеточного метаболизма воздействуют при создании штаммов-суперпродуцентов аминокислот?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Получение чистых L-аминокислот».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. *Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н.* Биотехнология. - М., 2006.

2. *Прищеп Т.П., Чучалин В.С.* и др. Основы фармацевтической биотехнологии. - Томск: НТЛ, 2006.

Лабораторная работа ? 8 Ферментация треонина. идентификация и определение содержания этой аминокислоты в культуральной жидкости

Цель работы: научиться проводить ферментацию аминокислот (на примере треонина), включая все подготовительные этапы, и осуществлять контроль данного процесса.

Целевые задачи

• выращивание посевного материала и засев ферментационной среды культурой плазмидного штамма*Escherichia coИ;*

• проведение ферментации треонина;

• идентификация и количественное определение треонина.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• набор аминокислот фирмы «Reanal» (Венгрия) или «Мегск» или аналогичные по квалификации (не менее 99% чистоты);

• нингидрин фирмы «Merck» или аналогичный;

• аммиак водный по ГОСТ 3760-79;

• спирт изопропиловый (пропанол-2) по ТУ 6-09-4344-77;

• спирт пропиловый (пропанол-1) для хроматографии по ТУ 6-89-783-76;

• этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300-76 или по ТУ 6-09-667-76;

• кислота ледяная уксусная по ГОСТ 61-75;

• вода дистиллированная;

• микробиологические петли;

• стерильные пробирки;

• чашки Петри с питательным агаром;

• микрошприц на 1-5 мкл или микропипетка;

• пластинки «Силуфол» размером 15х15 или 20х20 см;

• колбы мерные, калиброванные на 100 мл;

• пробирки с притертыми пробками на 10 мл. *Приборы*

• Лабораторные ферментеры с биопроцессором, оснащенные системой автоматического pH-статирования и системой измерения концентрации растворенного кислорода (из расчета 1 ферментер на 1 группу студентов из 10-15 человек). Ферментеры должны иметь следующее оборудование и оснастку:

- систему pH-статирования, датчик pH и насос для автоматической подачи в ферментер сахароаммиачной подпитки по сигналу от датчика pH;

- датчик растворенного кислорода, который служит для визуального контроля за ходом ферментации: по уровню поглощения кислорода культурой можно определить, в какой фазе находится культура (экспоненциальный рост, стационарное состояние или отмирание клеток);

емкость для подпиток, соединенную с ферментером силиконовым шлангом;

- посевную колбу для внесения в ферментер питательных сред и посевного материала, соединенную с ферментером силиконовым шлангом;

- колбу-брызгоулавливатель с фильтром на выходе воздуха из ферментера;

- фильтр для стерилизации подаваемого в аппарат воздуха.

• pH-метр.

• Стеклянная хроматографическая камера с притертой крышкой.

• Термоэлектровентилятор или электрополотенце для сушки.

• Автоклав.

• Спиртовки или газовые горелки. Суть работы

Получение треонина путем культивирования плазмидного штамма *Escherichia coИ* в ферментере и идентификация этой аминокислоты с помощью ТСХ.

Часть 1. Процесс ферментации треонина в ферментере в условиях интенсивной аэрации и pH-статирования при дробной подаче в среду источников углерода и азота по сигналу от датчика pH

Подготовительный этап

1. *Приготовление питательных сред и добавок.*

Продуцент треонина - штамм *E. coli* - способен расти на средах простого состава, содержащих источник углерода, аммонийного азота и минеральные соли. Клетки продуцента синтезируют треонин одновременно с ростом биомассы, и условия, оптимальные для роста биомассы, являются оптимальными для биосинтеза треонина. Посевная среда, где также необходимо соблюдать условия, оптимальные для роста биомассы, не отличается по составу от ферментационной среды.

Ферментационная и посевная среды содержат: сахарозу (30 г/л), $(NH_4)_2SO_4$ (5 г/л), K_2HPO_4 (2 г/л), $MgSO_4x7H_2O$ (0,4 г/л), $MnSO_4x5H_2O$ (0,02 г/л), $FeSO_4x7H_2O$ (0,02 г/л), дрожжевой автолизат (0,2 г/л).

Среды стерилизуют в автоклаве при 116 °С в течение 30 мин. При проведении ферментации в лабораторном ферментере начальный объем среды должен быть равен половине вместимости ферментационного стакана (начальный коэффициент заполнения - 0,5). По ходу ферментации, а также на этапе выращивания посевного материала

в ферментер должна поступать подпитка в виде смеси стерильного раствора сахара с раствором аммиака. Подпитку готовят, смешивая простерилизованный и охлажденный раствор сахара в концентрации 700 г/л с концентрированным раствором аммиака (14,7 н NH_4OH) в пропорции 10:5 для стадии ферментации. При приготовлении подпиток аммиак не стерилизуют. Для дозировки аммиака используют простерилизованную мерную емкость. Для одной ферментации требуется приготовить количество подпитки, равное половине объема ферментационной среды; при выращивании посевного материала - 1/5 от объема среды.

2. *Подготовка ферментера к работе.*

Ферментер с датчиками, подсоединенными шлангами и колбами, стерилизуют в автоклаве при 116 °С в течение 30 мин. На период стерилизации внутрь ферментера заливают воду так, чтобы рабочие части датчиков были погружены в воду. Вместо воды можно заливать среды, но в этом случае срок службы датчиков сокращается.

После стерилизации ферментер устанавливают на стойку, подсоединяют все датчики к измерительным приборам и на биопроцессоре задают программу ферментации (задание по температуре, числу оборотов мешалки, уровню pH-статирования, минимальной и максимальной скорости подачи реагентов и т.д.). Затем из ферментера через пробоотборник сливают воду и заливают туда под защитой пламени горелки среду. Для отбора жидкости из ферментера в нем создают повышенное давление, пережимая шланг на выходе воздуха из ферментера, и затем открывают пробоотборник. В подпиточную емкость заливают подпитку, шланги заправляют в насос. Устанавливают режим автоматического контроля за параметрами ферментации (температурой, оборотами мешалки). После того как температура в ферментере достигнет заданного уровня (31 °С), из аппарата отбирают пробу среды и калибруют pH-датчик ферментера по лабораторному pH-метру. Затем включают автоматическое pH-статирование. Одновременно калибруют датчик растворенного кислорода, устанавливая начальное значение его показаний, равное 100%.

3. *Засев ферментера и выращивание в нем посевного материала.* Жидкую культуру продуцента, хранящуюся в холодильнике и

предварительно проверенную на продуктивность и отсутствие посторонней микрофлоры, вносят в ферментер через посевную колбу. Обычно для засева посевного аппарата используют около 1% посевного материала.

Выращивание посевного материала (кишечной палочки - продуцента треонина) ведут в ферментере при следующих условиях:

• температура 37 °С;

• уровень pH-статирования - 7,0±0,2 (pH поддерживают благодаря автоматической подаче в ферментер сахароаммиачной подпитки);

• расход воздуха, подаваемого в ферментер за минуту, равен начальному объему среды;

• обороты мешалки должны обеспечивать скорость растворения кислорода не менее 5-7 л/ч;

• продолжительность выращивания посевного материала около 1 сут.

4. *Засев ферментационной среды посевным материалом.*

В лабораторных условиях выращивание посевного материала и ферментацию можно осуществлять в одном и том же аппарате: сначала выращивают посевной материал, затем часть жидкости из ферментера сливают и заливают свежую (ферментационную) среду. Оптимальная доза посевного материала при биосинтезе треонина составляет около 10%, поэтому в ферментере оставляют примерно 1/10 часть посевного материала и добавляют до исходного объема свежую среду.

Порядок выполнения работы

Ферментация треонина требует соблюдения тех же условий, что и выращивание посевного материала. Продолжительность процесса ферментации не превышает 2-х суток. Каждые 4-6 ч из ферментера отбирают пробы и определяют в них оптическую плотность, содержание аминокислот, концентрацию углеводов, величину pH. Аналогично биомассе, концентрация треонина в среде вначале возрастает экспоненциально. Максимальная скорость накопления треонина (3-5 г/л в час) достигается к середине 1-х суток культивирования (к моменту перехода клеток от экспоненциального роста к замедленному). Далее скорость синтеза начинает неуклонно уменьшаться. Удельный расход сахара в процессе биосинтеза треонина составляет в среднем 2-2,5 г на 1 г целевого продукта. Это означает, что примерно половину потребляемого сахара клетки расходуют на построение биомассы и энергетические нужды, а половину преобразуют в треонин. К концу 2-х суток культивирования в ферментере может накопиться до 100 г/л треонина, но обычно ферментацию останавливают раньше, когда концентрация треонина достигает 80 г/л.

Чтобы остановить ферментацию, требуется удалить из среды остаточный сахар. Для этого pH-статирующую сахароаммиачную подпитку заменяют раствором аммиака. Клетки продолжают потреблять из среды как углеводы, так и аммиак, но теперь с подпиткой получают только один аммиак. Концентрация сахара в среде при этом снижается. При исчерпании сахара клетки перестают дышать, перестают потреблять источник азота, и вместо закисления культуральная жидкость начинает защелачиваться. Защелачивание культуральной жидкости является сигналом к остановке ферментации.

После отделения биомассы (фильтрацией или сепарированием) из культуральной жидкости выделяют треонин методом ионного обмена на колоннах с ионообменной смолой. Раствор после ионообменных колонн упаривают и отделяют выпавшие кристаллы треонина. После повторных перекристаллизаций и очистки растворов на активированном угле получают препарат медицинского назначения.

Часть 2. Определение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Подготовительный этап

1. *Приготовление рабочих растворов.*

• Приготовление системы растворителей.

В качестве системы растворителей используют смесь: пропиловый спирт/аммиак водный в соотношении 7:3 по объему, или смесь: изопропиловый спирт-этилацетат/аммиак водный/вода дистиллированная в соотношении 40:40:14:32 по объему.

• Приготовление нингидринового реактива.

Готовят раствор нингидрина в ацетоне из расчета 1 г на 97 мл ацетона. Полученный раствор хранят в темной склянке не более 1 мес. Непосредственно перед использованием 97 мл этого раствора смешивают с 3 мл ледяной уксусной кислоты, получая нингидриновый реактив.

• Приготовление стандартных растворов.

В мерную колбу на 100 мл вносят 0,200 г аминокислоты, взвешенной с погрешностью ±0,0002 г. Навеску растворяют в 10% водном растворе изопропанола и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор (концентрация 2,0 г/л) используют для приготовления стандартных растворов: в три пробирки вносят по 2,5, 5,0 и 7,5 мл раствора, добавляют соответственно 7,5, 5,0 и 2,5 мл 10% водного раствора изопропанола и перемешивают. Полученные стандартные растворы

имеют концентрацию аминокислоты 0,5, 1,0 и 1,5 г/л. Растворы хранят в холодильнике в течение 2-4 нед.

2. *Подготовка хроматографической камеры.*

В чистую сухую камеру наливают систему растворителей в таком количестве, чтобы высота слоя жидкости составляла около 1 см. Камеру закрывают притертой крышкой, смазанной вакуумной или силиконовой смазкой. Для насыщения камеры парами растворителей ее выдерживают в течение 2-3 ч. В зависимости от интенсивности использования камеру можно применять без замены системы растворителей в течение 2-5 дней.

3. *Подготовка проб к анализу.*

Представленные на анализ пробы разводят водой таким образом, чтобы концентрация аминокислоты в разведенной пробе составляла от 0,5 до 1 г/л, при этом готовят не менее 2 разведений, исходя из ожидаемой концентрации аминокислоты в пробе.

Порядок выполнения работы

На стандартной пластинке «Силуфол» мягким простым карандашом проводят линию старта на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края пластинки. Затем микрошприцем или микропипеткой на линию старта наносят пробы стандартных растворов, а также разведенные пробы анализируемого раствора (по 1 мкл). Расстояние между наносимыми пробами, а также расстояние от краев пластинки должно быть не менее 1,2 см. Пластинку (или две пластинки) помещают в хроматографическую камеру и закрывают камеру крышкой. Окончание хроматографии (через 30-40 мин) определяют по прохождению растворителя на высоту 10-15 см от нижнего края пластинки.

Далее пластинку высушивают в токе теплого воздуха (при помощи фена или электрополотенца) до полного исчезновения запаха аммиака, после этого наносят раствор нингидрина. Проявление пятен проводят в течение 4-5 мин в токе теплого воздуха или в сушильном шкафу при 60 °С.

Сравнивая интенсивность окраски пятен, соответствующих пробам анализируемых и стандартных растворов, оценивают наличие и содержание аминокислоты в анализируемой пробе с учетом разведения.

Ошибка определения составляет ±10-15%.

Контрольные вопросы

• Какие параметры необходимо контролировать в процессе ферментации плазмидного продуцента треонина?

• Каким образом осуществляется автоматическое поддержание в среде оптимальных концентраций источника углерода и азота в процессе ферментации продуцента треонина?

• Укажите характер роста биомассы и накопления аминокислоты у штамма кишечной палочки - продуцента треонина.

• Назовите основные преимущества и недостатки биотехнологических методов получения аминокислот по сравнению с химическими.

• Почему при культивировании штаммов-суперпродуцентов аминокислот необходимо применение подпиток?

• Какие режимы ферментации используют при промышленном получении аминокислот?

ГЛАВА 3 ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Тема «Витамины и коферменты» посвящена биотехнологическим методам получения данных лекарственных препаратов. Представленный материал включает характеристики основных промышленных штаммов-продуцентов, особенности питательных сред, а также параметры их культивирования. На конкретных примерах показаны методы выделения, очистки и определения количественного содержания целевых продуктов. Подчеркивается преимущество использования биотехнологических методов в промышленном производстве витаминов и коферментов - создание перспективных малоотходных технологий получения ЛС.

Цель изучения темы: ознакомление с некоторыми биотехнологическими этапами, используемыми в фармацевтической промышленности для получения аскорбиновой кислоты и убихинонов, в частности убихинона 10.

Данная тема представлена двумя семинарскими занятиями, каждое из которых включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ.

На первом занятии выполняют лабораторную работу «Трансформация D-сорбита в L-сорбозу микроорганизмами вида *Gluconobacter oxydans».* На втором - «Количественное определение убихинона-10 из биомассы бактерий *Gluconobacter oxydans».*

Для каждой лабораторной работы приведены цели и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВИТАМИНА С♠

Введение

Витамины и коферменты являются профилактическими и лечебными препаратами, обладающими широким спектром фармакотерапевтического действия в различных областях медицинской практики. В последнее время достигнуты большие успехи в их промышленном получении с помощью биотехнологических методов. В табл. 7 приведены микроорганизмы-продуценты, наиболее широко используемые в микробиологическом синтезе витаминов и коферментов.

Таблица 7. Микроорганизмы, используемые в биотехнологии водорастворимых витаминов

Витамины	Микро-организмы-продуценты	Продуктив-ность	Основные компоненты среды	Предшествен-ники
B_{12}	*Propionibacterium P.shermanii Pseudomonas denitrificans*	1,0–8, 58, 59 мг/л	Кукурузный экстракт, глюкоза, соли кобальта, сульфат аммо-ния	5,6-диметил-бензимидазол
B_2 и флави-наденинди-нуклеотида (Рф и ФАД)	Грибы *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossipii Bacillus subtilis E. ashbyii* (гриб) *Sarcina lutea*	3,8 г/л Рф, 6,4 г/л Рф, 3,5–4,5 г/л Рф, 0,65 г/л ФАД, 1 г/л ФАД	Кукурузная, соевая мука, кукурузный экстракт, сахар, техни-ческий жир. Меласса, дрожжевой экстракт. Глюкоза, мальтоза	ФАД, аденин

Окончание таблицы 7

B_3 и кофер-мент А (пан-тотеновая кислота, коф. А)	*E. coli* ATCC-9637 *Actinomycetes Brevibacterium ammoniagenes*	130 КоА, 2,5 г/л КоА	Крахмал	0
Vit PP (нико-тиновая кис-лота)	*Saccharomyces carlsbergensis Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872	750 мг/л, 6 г/л	0	3-метилпири-дин
Аскорби-новая кислота, Vit C	*Gluconobacter oxydans Acetobacter Erwinia punctata*	Выход составляет 87–90% от количества глюкозы в среде	0	сорбит-сорбоза, 2-кето-L-гулоновая кислота

Один из классических примеров промышленного использования микроорганизмов в получении витамина С* - превращение D-сорбита в L-сорбозу бактериями *Gluconobacter oxydans.* L-сорбоза является промежуточным продуктом синтеза аскорбиновой кислоты, проводимого обычно по методу Рейхштейна (рис. 2). Процесс получения L-сорбозы биотехнологическим способом основан на способности различных штаммов уксуснокислых бактерий к селективному окислению сорбита. В отличие от химического процесса, где в результате окисления сорбита получается смесь продуктов, окислительная трансформация уксуснокислых бактерий характеризуется необычайно точным воздействием на определенные группы в молекулах этих веществ. Данные бактерии превращают многоатомные спирты в сахара, дегидрируя вторичную спиртовую группу полиола в соответствии с правилом Бертрана-Хадсона: «Из двух вторичных спиртовых

групп, находящихся в цис-положении, дегидрируется та, которая примыкает к первичной спиртовой группе» (рис. 2, выделенная часть).

Наиболее сильной окислительной способностью обладают штаммы *Gluconobacter oxydans* и *Acetobacter melanogenum.* Для получения сорбозы G. *oxydans* выращивают в питательных средах, содержащих высокие концентрации сорбита и дрожжевой или кукурузный экстракт, которые служат источниками азота, витаминов и других

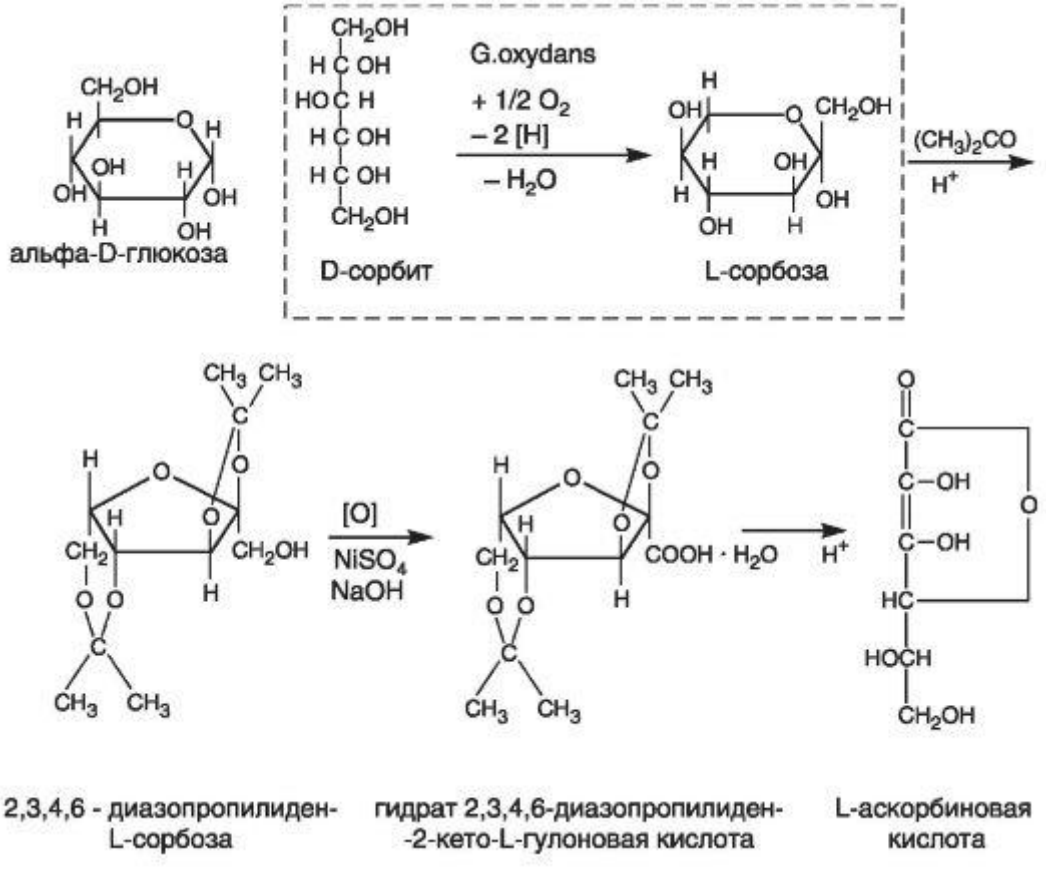


Рис. 2. Синтез L-аскорбиновой кислоты по методу Рейхштейна

веществ, обеспечивающих рост бактерий. Для роста продуцента и окисления сорбита в сорбозу необходимо постоянное поступление кислорода в культуральную жидкость. При высоких концентрациях сорбита лишь небольшая его часть затрачивается на синтез биомассы бактерий. Основное количество сорбита трансформируется в сорбозу, степень конверсии составляет 96-98%. В ходе процесса происходит снижение pH культуральной жидкости. По окончании трансформации фильтрат концентрируют в вакуум-аппаратах при 60 °С. При охлаждении сорбоза выпадает в осадок в виде кристаллов.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: практическое обоснование эффективности использования биотехнологических методов в промышленном производстве витаминов и коферментов.

К занятию необходимо знать:

• микроорганизмы-продуценты и условия культивирования, используемые в промышленном получении витаминов и коферментов;

• правило Бертрана-Хадсона на примере трансформации D-сор- бита в L-сорбозу;

• схему биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу. К занятию необходимо уметь:

• работать с поляриметром;

• осуществлять микроскопический контроль чистоты штамма;

• проводить расчет степени конверсии сорбита в сорбозу.

Контрольные вопросы

• Перечислите витамины, промышленное производство которых основано на использовании биотехнологических методов.

• На чем основана классификация витаминов?

• Почему основную часть витаминов от общего количества производимых в мире получают химическими методами?

• Какое сырье является основным источником получения витаминов?

• Почему потребность организма человека в водорастворимых витаминах выше, чем в жирорастворимых?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Биотехнология витаминов и коферментов».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. Промышленная микробиология / под общ. ред. проф. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989.

2. *Елинов Н.П.* Основы биотехнологии. - СПб., 1995.

Лабораторная работа ? 9 Трансформация D-сорбита в L-сорбозу микроорганизмами вида *Gluconobacter oxydans*

Цель работы: определение показателей процесса микробиологического окисления сорбита в сорбозу.

Целевые задачи

• овладение навыками засева и культивирования штамма *G. oxydans;*

• микроскопирование культуральной жидкости с живыми клетками бактерий;

• определение содержания сорбозы в культуральной среде с помощью поляриметра.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• стерильные пипетки на 5 мл;

• колбы емкостью 750 мл;

• моровская пипетка;

• 24-48-часовая культура штамма *Gluconobacter oxydans;*

• агаровая среда;

• 5% раствор едкого натра;

• 50% раствор азотнокислого свинца;

• дистиллированная вода. *Приборы:*

• термостат;

• качалка;

• поляриметр портативный П-161;

• микроскоп.

Суть работы

Получение промежуточного продукта синтеза аскорбиновой кислоты L-сорбозы биотехнологическим способом и расчет количества сорбита, трансформированного в сорбозу.

Подготовительный этап

Используют один из штаммов *G. oxydans,* выращенных в пробирке на скошенном питательном агаре с сорбитом. Окисление сорбита в сорбозу проводят в среде следующего состава: сорбит (100 г/л), ферментолизат биомассы микроорганизмов без оболочек (5 г/л), вода водопроводная, pH от 5,6 до 5,9 (доводится при помощи серной кислоты или едкого калия). Среду разливают по 50 мл в колбы емкостью 750 мл, колбы закрывают ватными пробками, стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Посевным материалом служит 24-48-часовая культура штамма *Gluconobacter oxydans.* При помощи стерильной пипетки из колбы с питательной средой в пробирку с посевным материалом переносят 2-3 мл среды, суспендируют в ней биомассу бактерий с поверхности агаровой среды при помощи бактериологической петли или смывают биомассу путем встряхивания пробирки. Полученную суспензию

переливают в колбу с жидкой стерильной питательной средой. Все операции выполняют у пламени газовой горелки с соблюдением условий стерильности.

Порядок выполнения работы

• Засеянную колбу помещают в термостатную комнату на качалку, обеспечивающую постоянное перемешивание и поступление воздуха в жидкость. Развитие бактерий и окисление сорбита в сорбозу происходит в глубинных условиях. Температура в термостатной комнате составляет +30±1 °С. Продолжительность инкубации около 24 ч. Необходимо отметить точное время начала и окончания инкубации. Одну колбу со стерильным раствором оставляют в качестве контроля и инкубируют ее в тех же условиях, что и засеянные колбы.

• Затем проводят микроскопирование культуры. Для этого каплю культуральной жидкости с живыми клетками бактерий помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при увеличении в 420 раз. Клетки *Gluconobacter oxydans* могут иметь форму палочек или круглых и овальных клеток, одиночных, соединенных по две или в более длинные цепочки. В тех случаях, когда условия культивирования нарушены, *G. oxydans* способны образовывать инволюционные формы (гипертрофированные клетки, нитевидные, со вздутиями), которые растут, но не размножаются.

• Для определения содержания сорбозы в культуральной жидкости используют поляриметрический метод, основанный на измерении оптической активности растворов сорбозы. Предварительно проводят осветление раствора путем осаждения белковых веществ. В мерную колбу на 10 мл заливают дистилированную воду примерно на треть объема. Моровской пипеткой количественно переносят в колбу 1 мл раствора, прибавляют 0,1 мл 5% едкого натра и 0,1 мл 50% азотнокислого свинца. Содержимое колбы перемешивают, доводят до метки дистилированной водой, энергично встряхивают и дают отстояться в течение 5 мин, затем отфильтровывают через несколько слоев фильтровальной бумаги. Фильтрат должен быть полностью прозрачным. Поляриметрическую трубку заполняют фильтратом, помещают ее в камеру поляриметра портативного П-161 и по цифровой шкале определяют угол вращения плоскости поляризации света. Величина угла вращения зависит от концентрации сорбозы.

Содержание сорбозы (С) в культуральной жидкости в граммах на 100 мл вычисляют по формуле:

$C = 0,396 * P * A,$

где 0,396 - переводной коэффициент с сахарной шкалы на сорбозу; Р - показатель шкалы поляриметра; А - разведение пробы в мерной колбе.

Расчет количества сорбита, трансформированного в сорбозу в процессе ферментации (в %), производят по формуле:

$X = C/B*100$,

где С - содержание сорбозы в г/100 мл; В - содержание сорбита в

г/100 мл (1 г/100 мл).

В результате проведенной работы оформляют таблицу показателей процесса микробиологического окисления сорбита в сорбозу:

- форма бактериальных клеток;
- сорбоза (г/100 мл);
- степень конверсии сорбита в сорбозу (%).

Контрольные вопросы

- В чем заключается отличие получения L-сорбозы биотехнологическим способом от химического процесса?
- Почему биосинтез гулоновой кислоты (важнейший промежуточный продукт при промышленном получении витамина С*) из сорбозы также можно осуществлять, используя штаммы рода *Gluconobacter?*
- Какие компоненты и с какой целью добавляют в питательную среду при получении сорбозы?
- Почему необходим микроскопический контроль культуральной жидкости, содержащей живые клетки уксуснокислых бактерий?
- Как можно определить, что условия культивирования *G. oxydans* нарушены?
- Приведите схему синтеза аскорбиновой кислоты по методу Рейхштейна.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 7. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ (НА ПРИМЕРЕ ЭКСТРАКЦИИ УБИХИНОНА-10 ИЗ БИОМАССЫ *GLUCONOBACTER OXYDANS)*

Введение

Наиболее распространенная форма классификации витаминов - их деление на две группы: водо- и жирорастворимые. В занятии ? 6 продемонстрирован классический пример использования биотехнологических методов для получения водорастворимого витамина С* - превращение D-сорбита в L-сорбозу с помощью культуры штамма *Gluconobacter oxydans.* Большое внимание в биотехнологическом производстве уделяют также получению жирорастворимых витаминов, в частности убихинонов и менахинонов. Как известно, витамины группы Д, каротиноиды, убихиноны и витамины группы К объединены на основании общих начальных стадий биосинтетического пути в одну общую группу терпенов или терпеноидов. Терпеноидные соединения являются высокоактивными биологическими веществами, имеющими широкое применение в

медицинской практике. Их промышленное производство в основном осуществляется с помощью микробиологического синтеза. В табл. 8 представлены микроорганизмы-продуценты, используемые при получении вышеуказанных ЛС.

Таблица 8. Микроорганизмы, используемые в биотехнологии при получении убихинонов и менахинонов

Витамины	Микро-организмы-продуценты	Продуктив-ность	Основные компоненты среды	Предшест-венники
D_2 (эргокаль-циферол)	*Saccharomyces cerevisiae, Candida guillier-mondii*	0	Источники углеводов, азота, фос-фора	0

Окончание таблицы 8

β-каротин	Другие виды дрожжей и плес-невые грибы, *Blakeslea trispora*	3–4 г/л	Кукурузно-соевая мука; раститель-ные масла, керосин, ПАВ, спец-ифические стимуляторы (β-ионон)	0
Коферменты-убихиноны (Ко Q_9, Ко Q_{10})	*Cryptococcus curvatus, Candida guilliermondii, Gluconobacter oxydans* (ВНИВИ-6), *G. oxydans* (ВНИВИ-2)	5,6 мг/л, 7 мг/л	0	0
K_2 (менахино-ны)	*Flavobacterium meningosepticum, F. meningosepticum* IFO 12535	21,3 мг/л, 55,6 мг/л	Глицерин, пептон, дрожжевой экстракт, минеральные соли	Шикимат, О-бензоат, изопенте-ниловый спирт, L-тирозин

Характеристика убихинонов

В последнее время значительно возрос интерес к убихинонам в связи с большими перспективами их применения в качестве лечебных препаратов. Убихиноны представляют одну из групп природных биохинонов, которые играют существенную роль в таких биологических процессах, как фотосинтез, транспорт электронов, окислительное фосфорилирование. По биологической значимости их обычно приравнивают к соединениям типа АТФ, НАДФ, цитохромов. Известны следующие главные группы

терпеноидных биохинонов: токохиноны, пластохиноны (РО), убихиноны (Q), менахиноны (МК, витамины $К_2$) и филлохиноны (К, витамин $К_1$).

Коферменты-убихиноны обозначают Ко Q_n, где n - цифровой индекс, показывающий число пренильных (изопреноидных) звеньев

в боковой цепи. Число пренильных звеньев в убихинонах может варьировать от 1 до 13.

Убихиноны широко распространены в природе. Их синтезируют животные, растения и микроорганизмы. Количество убихинонов в определенной мере отражает окислительную активность ткани. У высших растений и животных убихиноны в основном сосредоточены на внутренней мембране митохондрий и микросомах. Главным убихиноном человека и целого ряда животных является Ко Q_{10}.

Как было сказано выше, убихиноны относятся к витаминоподобным соединениям, которые синтезируются в организме человека. Однако в ряде случаев может возникнуть их дефицит, приводящий к развитию различных патологических состояний (например, анемии).

Промышленное получение убихинонов

При промышленном производстве Ко Q_{10} с последующим использованием его в терапевтических целях существует метод его экстракции из тканей животных, однако в силу ограниченной доступности источников выделения и низкого содержания в них кофермента этот способ не является основным. Главным образом промышленное получение высших гомологов убихинонов базируется на биотехнологических методах: микробиологическом синтезе, обеспечивающем трансконфигурацию боковой цепи и экстракцию Ко Q_{10} из культур растительных клеток. Многие представители микроорганизмов синтезируют убихиноны, причем тип главного Ко Q_{10} у микроорганизма имеет таксономическое значение. Богатым источником убихинонов являются бактерии. В связи с этим перспективное направление получения Ко Q_{10} - использование биомасс бактерий, отходов уже действующих производств.

Установлено, что биомасса уксуснокислых бактерий, используемых в промышлен

ности для окисления D-сорбита в L-сорбозу, содержит Ко Q_{10} без примеси его гомологов. При этом штамм G. *oxydans* ВНИВИ-6 продуцирует 5,6 мг/л, а штамм ВНИВИ-2 -до7 мг/л убихинона Q_{10}. В настоящее время разработана технология, при которой одновременно осуществляется биосинтез Ко Q_{10} и окисление D-сорбита в L-сорбозу, причем при экстракции убихинона Q_{10} из отсепарированной биомассы, являющейся отходом производства, выход конечного продукта может достигать 85%. Кроме того, на этом примере можно видеть одну из характерных особенностей биотехнологического получения витаминов и коферментов: возможность создания малоотходных производств - наиболее перспективного направления развития промышленного производства ЛС.

Методы выделения и количественного определения убихинонов

В настоящее время для выделения и количественного определения убихинонов предложен целый ряд методов. Их использование обычно определяется характером биообъекта, наличием сопутствующих веществ, однако любой из методов состоит из следующих основных этапов: экстракция, хроматографическое разделение полученного материала и количественное определение убихинонов.

Способы экстракции убихинонов из биообъектов

Высшие гомологи убихинонов - Ко Q_{7-10} - при комнатной температуре являются кристаллическими веществами желтого цвета, низшие - жидкости. Убихиноны легко растворимы в жирах и в большинстве органических растворителей и практически не растворимы в воде. Для их экстракции из биомассы обычно используют различные органические растворители. С целью наиболее полного выделения убихинонов биомассы предварительно дополнительно разрушают, дезинтегрируя с помощью ультразвука, или гидролизуют в щелочной среде. Чаще всего исходный материал предварительно гидролизуют спиртовым раствором щелочи, но иногда применяют и прямую экстракцию из нативных или лиофилизированных тканей. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. При омылении разлагается большинство сопутствующих веществ, поэтому убихиноны в дальнейшем легко выделяются хроматографическими методами, но при этом возможно разрушение связанного убихинона и в случае употребления этанольного раствора щелочи замещение метоксильных групп этоксильными.

Для прямой экстракции обычно используют смеси этанол/эфир (3:1), хлороформ/метанол (3:1), ацетон и т.д. При этом из тканей выделяется большое количество липидов, которые затрудняют дальнейшую хроматографию и спектрофотометрию.

Для проведения редокс-реакции убихиноны экстрагируют из гомогенатов неполярными углеводородами при низкой температуре в присутствии метанола.

Хроматографические методы выделения убихинонов

От сопутствующих липидов убихиноны отделяют с помощью препаративной колоночной или ТСХ. Для разделения гомологов используют бумажную или тонкослойную хроматографию с обращенной фазой, а также колонки, заполненные порошком полиамида.

Один из наиболее часто применяемых методов выделения убихинонов - ТСХ. Как известно, в ТСХ адсорбентом служит тонкий равномерный слой (обычно толщиной 0,24 мм) сухого мелкоизмельченного материала, нанесенного на соответствующую подложку (стекло, алюминиевую фольгу, пластмассовую пленку). Подвижная фаза движется по поверхности пластинки под действием капиллярных сил. Хроматографический процесс зависит от используемого адсорбента и систем растворителей. После окончания процесса исследуемое вещество элюируют соответствующим растворителем.

Количественные методы определения убихинонов

Существует ряд методов количественного определения убихинонов. Для этих целей используют реакции с борогидридами и этилцианацетатом. Реакция с этилцианацетатом является достаточно специфичной, и ее обычно применяют при работе с многокомпонентной смесью. Описаны также газохроматографические и ферментативные методы определения убихинонов. Наиболее распространенный и простой способ количественной оценки убихинонов - спектрофотометрический метод.

Характерный максимум поглощения для убихинонов находится в УФ-области (275 нм). При мягком восстановлении убихинон превращается в убихинол, и максимум поглощения смещается до 290 нм, что дает возможность измерять количество вещества, используя различия спектров окисленной и восстановленной форм.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

- колба (500 мл) с притертой пробкой;
- микропипетка (20 мкл);
- культура штамма *Gluconobacter oxydans;*
- ацетон;
- смесь хлороформ/этанол (1:1);
- система хлороформ/этиловый эфир (8:2);
- пластины «Силуфол» (УФ-254). *Приборы:*
- спектрофотометр;
- качалка;
- хроматографическая камера. Суть работы

Получение экстракта убихинона-10 и его выделение с помощью ТСХ; спектрофотометрическое определение содержания Ко Q_{10}.

Подготовительный этап

Экстракция Ко Q_{10} *из биомассы G. oxydans*

После получения L-сорбозы к отсепарированной биомассе G. *oxydans* добавляют ацетон в соотношении 1:3. Для улучшения условий экстракции колбу, закрытую притертой пробкой, помещают на качалку. Инкубацию проводят при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный экстракт отделяют от биомассы фильтрацией.

Порядок выполнения работы

Выделение Ко Q_{10} с помощью тонкослойной хроматографии В работе для ТСХ используют пластины, в которых слой силикагеля содержит флуоресцирующее при облучении УФ-лучами вещество. Подложкой является алюминиевая фольга. Пластину помещают в хроматографическую камеру, защищенную от прямых лучей света. Работу проводят в условиях насыщенной камеры. Для этой цели в нее помещают фильтровальную бумагу, на которую наносят элюент в таком количестве, чтобы достигнуть насыщения фильтровальной бумаги и образовать слой глубиной около 5 мм. Затем камеру закрывают и оставляют при комнатной температуре в течение 1 ч.

На приготовленную пластину наносят фильтрат (5-20 мкл) в виде компактного пятна диаметром не более 4 мм. Для нанесения используют микропипетки или шприц. Пятно должно находиться на расстоянии около 1,5 см от нижнего края и не менее чем на 2 см от боковой стороны пластины. Пластину помещают в хроматографическую камеру в вертикальном положении. После окончания хроматографического процесса убихиноны определяют, облучая пластину УФ-светом. Область пластины с флуоресцирующими пятнами вырезают. Вещество, образующее пятно, элюируют соответствующим растворителем для проведения спектрофотометрического измерения.

Количественное определение Ко Q_{10} спектрофотометрическим методом Полученный после ТСХ раствор заливают в кювету (L = 1 см) для определения его оптической плотности (А). Измерение проводят на спектрофотометре при длине волны 275 нм. Содержание Ко Q_{10} (в %) определяют по следующей формуле:

$$\text{Содержание Ко } Q_{10} = \frac{A}{165} \times 100,$$

где 165 - коэффициент поглощения 1% раствора убихинона-10 при 275 нм; А - результат измерения оптической плотности раствора при длине волны 275 нм.

Следует иметь в виду, что в экстракте могут присутствовать другие вещества, имеющие аналогичные спектры поглощения. В связи с этим расчетное значение содержания Ко Q_{10} может быть несколько завышенным. Для более корректного определения количества убихинонов используют их свойство изменять характер УФ-спектра при добавлении к раствору восстановителя (например, НАДФ Н).

В кювету, содержащую экстракт, добавляют 5 мкл раствора восстановителя. Быстро перемешивают и измеряют оптическую плотность при 275 м.

Содержание Ко Q_{10} (в %) рассчитывают по формуле:

$$\text{Содержание Ко } Q_{10} = \frac{\text{А ок.} - \text{А восст.}}{142} \times 100,$$

где А ок. и А восст. - результаты измерения оптической плотности раствора при длине волны 275 нм до

и после восстановления соответственно; 142 - разность поглощений 1% растворов окисленной и восстановленной форм убихинона.

Контрольные вопросы

• Укажите методы количественного определения убихинонов и охарактеризуйте их.

• Почему промышленное получение высших гомологов убихинонов базируется в основном на микробиологическом синтезе?

• Какие свойства отличают убихиноны от группы витаминов?

• Почему при промышленном получении Ко Q_{10} используют биомассу живых клеток именно уксуснокислых бактерий *(G. oxydans)?*

• Почему при спектрофотометрическом определении содержания убихинонов к раствору добавляют восстановитель?

ГЛАВА 4 СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Тема «Стероидные гормоны» посвящена методам биотрансформации исходного растительного сырья при получении гормональных ЛС стероидной структуры. Представлены основные типы химических модификаций, осуществляемые промышленными штаммамибиотрансформаторами, приведена классификация микробиологических трансформаций, показано преимущество использования биотехнологических методов в промышленном производстве стероидных лекарственных препаратов.

Цель изучения темы: ознакомление с методологией проведения биотрансформации при переводе ситостерина^{р} в андростендион^{р} (АД), а также гидрокортизона в преднизолон с использованием клеток*Absidia globiformis,* иммобилизованных в полиакриламидном геле (ПААГ).

Данная тема представлена двумя семинарскими занятиями, каждое из которых включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ.

На первом занятии выполняется лабораторная работа «Окислительное отщепление боковой цепи ситостерина^{р} с образованием АД с помощью микроорганизмов-биотрансформаторов». На втором - работа «Проведение биотрансформации гидрокортизона в преднизолон с помощью иммобилизованных клеток*Absidia globiformis»,* состоящая из двух частей: определение оптимальных условий процесса биотрансформации гидрокортизона в преднизолон; определение степени биотрансформации.

Для каждой лабораторной работы приведены: цели и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Введение

В медицинской практике в качестве противовоспалительных, диуретических, анаболических, контрацептивных, противораковых и других ЛС применяют стероидные гормональные препараты. Наиболее важные из них - кортикостероиды, гестагены, эстрогены и андрогены. Структура основных представителей перечисленных групп стероидных препаратов представлена на рис. 3.

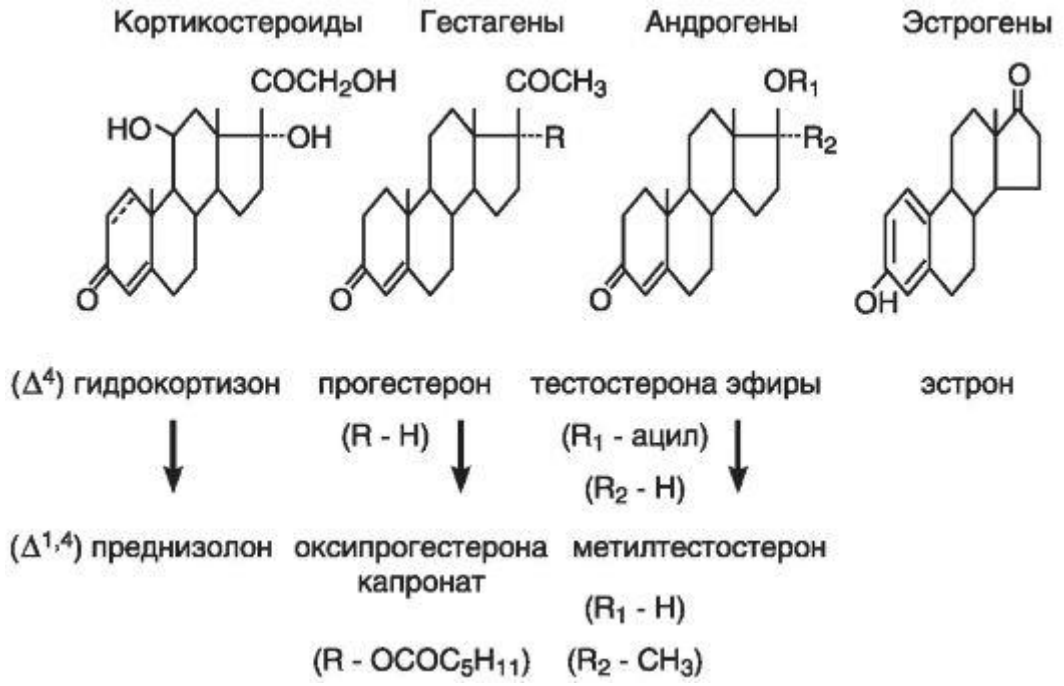


Рис. 3. Структура важнейших стероидных гормонов

Для синтеза указанных гормонов используют природные соединения, ядром молекулы которых является специфическая циклическая структура - циклопентанпергидрофенантрен. Проведение различных химических модификаций этой структуры дает возможность получать ценные ЛС.

Производство стероидных препаратов в нашей стране основано на использовании соласодина[р] и ситостерина[р] или же импортного диосгенина[р]. Соласодин[р] выделяют из паслена дольчатого, который выращивают на поливных землях в Казахстане, однако урожайность и процентное содержание соласодина[р] в этом растительном сырье сравнительно низкие. Более экономичный вид сырья - ситостерин[р], который широко распространен в природе: содержится во всех растениях и может быть выделен из отходов от переработки древесины и целлюлозно-бумажной промышленности (рис. 4).

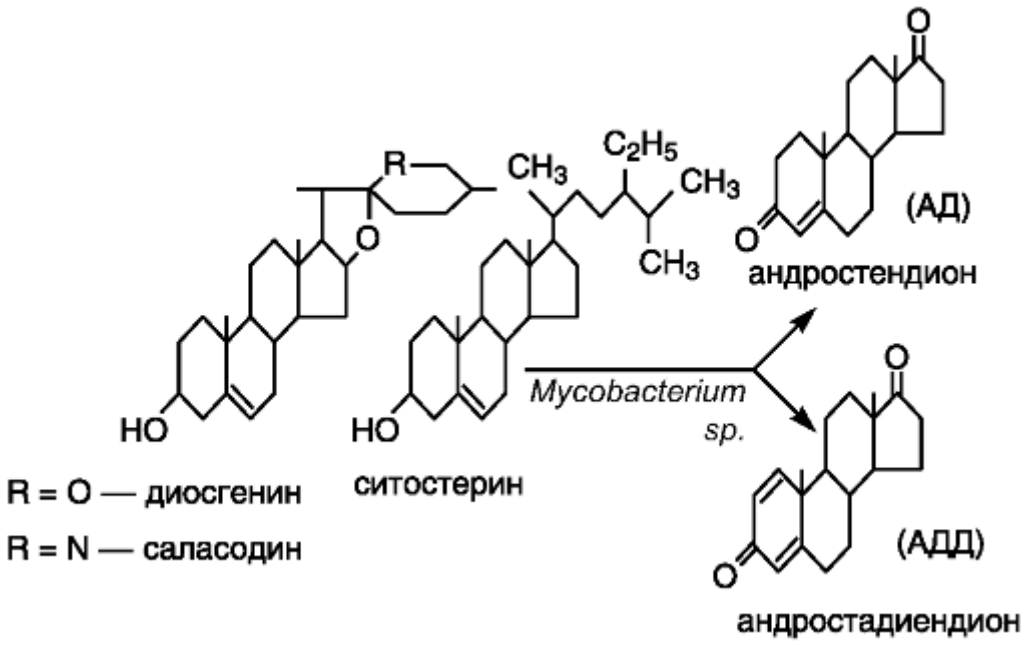


Рис. 4. Исходное сырье, используемое при синтезе стероидных препаратов

На этапах производства стероидных препаратов из ситостерина[p] вначале необходимо получить АД. Это превращение в производственных условиях выполняют микобактерии, и поэтому процесс относят к категории биотрансформационных. Образующийся в результате биотрансформации АД накапливается в культуральной жидкости, из которой его извлекают экстракцией хлористым метиленом. Экстрагированный АД образует кристаллы в гексане. Полученный кристаллический АД далее путем химической модификации превращают в следующие лекарственные препараты: тестостерон и его эфиры, метилтестостерон, оксипрогестерона капроат, спиронолактон и др.

Биотрансформация, основанная на использовании микроо

рганизмов из родов *Absidia* и *Curvularia,* служит этапом при производстве

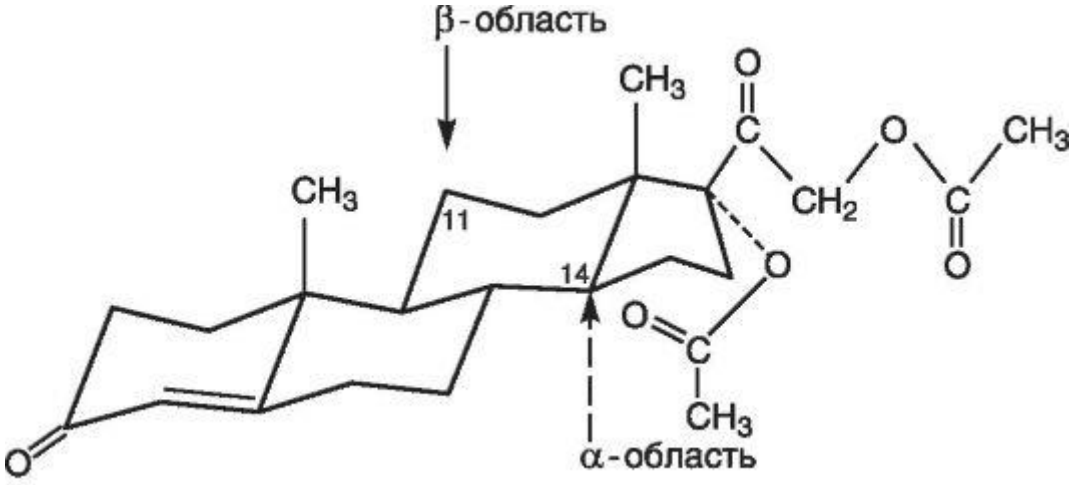


Рис. 5. Структура диацетата вещества S

гидрокортизона. В этом случае исходным продуктом для гидроксилирования является вещество S (рис. 5).

Ферменты, вырабатываемые микроорганизмами, атакуют β-область и трансформируют вещество S в гидрокортизон. Применение в качестве субстрата не вещества S, а его диацетата, позволяет увеличить выход целевого продукта с 50 до 70-73%. Повышение выхода гидрокортизона происходит в результате предпочтительного гидроксилирования в 11-β положении за счет «экранирования» (подавления) этого процесса в 11-α положении.

Микробиологическое дегидрирование стероидов также имеет большое практическое значение, поскольку введение $\Delta^{1,2}$-двойной связи способствует повышению физиологической активности. Например, преднизолон, являющийся 1, 2-дегидроаналогом гидрокортизона, превосходит последний по своей противовоспалительной и антиаллергической активности и вместе с тем дает меньше побочных эффектов при терапевтическом использовании.

К дегидрированию стероидов в положении 1, 2 способны преимущественно бактерии и актиномицеты. В промышленном производстве гидрокортизона и преднизолона процессы гидроксилирования и дегидрирования осуществляют при концентрации стероидного субстрата 1 г/л, при этом значительная часть стероида находится в культуральной жидкости в растворенном состоянии. Именно поэтому для извлечения вышеуказанных препаратов культуральную жидкость экстрагируют несмешивающимися с водой растворителями, например этилацетатом. Затем экстракт упаривают в вакууме, а выделенный стероид очищают

кристаллизацией. При экстракции стероида из культуральной жидкости затрачиваются огромные объемы растворителя этилацетата: 2000-3000 л на каждый килограмм полученного продукта. Даже с учетом регенерации расход растворителя остается все же большим - около 300 л. Вот почему весьма перспективным считают использование ультрафильтрации и обратного осмоса для концентрирования культуральной жидкости с целью уменьшения количества растворителя, потребляемого для экстракции. Кроме того, можно вообще не использовать растворитель при достаточно полном выделении стероида в кристаллическом виде в процессе концентрирования культуральной жидкости.

адание для самоподготовки

Цели изучения темы занятия:

• овладеть навыками использования ферментной системы микобактерий для биотрансформации ситостерина^{p} в АД;

• освоить методику количественного определения АД в культуральной жидкости.

К занятию необходимо знать:

• способы биотрансформации ситостерина^{p}, вещества S и его диацетатов;

• аппаратурное оформлением процесса биотрансформации полупродуктов стероидной структуры;

• схему биотрансформации ситостерина^{p} в АД и вещества S в гидрокортизон.

К занятию необходимо уметь:

• провести посев культуры микобактерий;

• произвести выделение и кристаллизацию АД;

• рассчитать количественное содержание стероида;

• определить степень измельчения размолотого полупродукта (ситостерина^{p}) и вид кристаллов;

• измерить на спектрофотометре оптическую плотность полученных растворов;

• рассчитать содержание стероида в культуральной жидкости.

Контрольные вопросы

• Назовите виды сырья, используемого для синтеза стероидных гормонов.

• Почему экстракция и выделение стероидов после биотрансформации представляют собой трудную задачу?

• Приведите характеристики четырех основных групп стероидных препаратов.

• Какие принципы использования биотрансформации при получении стероидных гормонов вам известны?

• Что такое вещество S и где его используют?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Получение стероидных гормонов биотехнологическими методами».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная:

1. *Быков В.А., Крылов А.И., Манаков М.Н.* и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. - М.: Высшая школа, 1987.

2. *Быков В.А., Далин М.В.* Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие. - М.: Минздрав СССР, Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, 1991.

Лабораторная работа ? 11 Окислительное отщепление боковой цепи ситостерина^{p} с образованием андростендиона^{p} с помощью микроорганизмов-биотрансформаторов

Цель работы: получение основного сырья для химического синтеза стероидных препаратов методом инкубирования природного ситостерина^{p} растительного происхождения (из сои, лиственных деревьев) с использованием ферментной системы микобактерий и последующим выделением и идентификацией АД.

Целевые задачи

• выращивание культуры микобактерий штамма Р;

• проведение трансформации смешиванием культуры микобактерий со стерильной суспензией ситостерина^{р};

• идентификация и количественное определение АД.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• микропипетка;

• мерный цилиндр;

• культура микобактерий штамма Р;

• жидкая питательная среда;

• кристаллический ситостерин^{р};

• смесь хлороформ/этанол (1:1);

• система хлороформ/этиловый эфир (8:2);

• пластины «Силуфол» (УФ-254). *Приборы:*

• термостат;

• качалка;

• роторный испаритель;

• весы аналитические;

• микроскоп;

• спектрофотометр.

Суть работы

Биотрансформация ситостерина^{р} в полупродукт для химического синтеза стероидных лекарственных препаратов (АД) и количественное его определение.

Подготовительный этап

• Проводят посев культуры микобактерий штамма Р на жидкую питательную среду, включающую в качестве источника углерода глюкозу, сахарозу; в качестве источника азота - гидролизат ББК; в качестве источника фосфора - K_2HPO_4. Затем проводят микроскопирование культуры.

• Подготавливают исходный стероид (ситостерин^{p}) для трансформации в АД путем измельчения на специальной установке. Для определения степени измельчения и вида кристаллов размолотый ситостерин^{p}микроскопируют.

Порядок выполнения работы

• Смешивают культуру микобактерий со стерильной суспензией ситостерина^{p} в концентрации 10 г/л. Биотрансформацию проводят инкубированием в термостате при 20 °С на качалке в течение 6 ч.

• Через каждые 2 ч пипеткой осуществляют отбор проб в объеме 20 мл. В каждую пробу добавляют 20 мл хлороформа и перемешивают на качалке 15 мин при 20 °С. Из нижнего слоя в мерный цилиндр сливают 20 мл раствора, переносят в колбу и упаривают на роторном испарителе.

• Осадок в колбе растворяют в смеси хлороформ/этанол (1:1) и наносят микропипеткой 0,01 мкл на пластину с «Силуфолом» (УФ-254). Затем пластину хроматографируют в системе хлоро-

форм/этиловый эфир (8:2), высушивают и просматривают в УФ, после чего кусочек пластинки, соответствующий АД, вырезают. После всех перечисленных процедур стероид в течение 15 мин элюируют этанолом (10 мл) и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 212 нм. Расчет количества стероида производят по формуле:

$$\text{Количество стероида в пробе (ммг)} = \frac{n \times 10 \times a}{559 \times 0{,}01 \times 100},$$

где n - показатель спектрофотометра;

10 - объем этанольного элюата;

а - объем растворителя осадка из колбы;

559 = Е - коэффициент экстинкции (оптическая плотность для 1 мг в 100 мл растворителя); 0,01 - объем пробы на ТСХ; 100 - пересчет в мг.

Примечание. Из 40 мл хлороформного раствора упаривают только 20 мл, что соответствует 10 мл культуральной жидкости, поэтому, умножив на 100 рассчитанную по формуле величину АД в мг, получают количество мг АД в 1 л.

Контрольные вопросы

• Назовите преимущества использования биотрансформации ситостерина^{p} в АД и вещества S в гидрокортизон.

• В чем заключается принцип контроля процесса биотрансформации стероидов?

• Укажите способы выделения АД из культуральной жидкости, в которой происходила биотрансформация ситостерина[р], и его очистки.

Какие существуют возможности усовершенствования процесса извлечения биотрансформированных стероидов из культуральной жидкости?

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* (РЕАКЦИЯ 1, 2-ДЕГИДРИРОВАНИЯ)

Введение

Стероидные гормоны - БАВ, лекарственные формы которых используют в качестве профилактических и лечебных препаратов. В последнее время диапазон их применения в практической медицине значительно расширился. Стероидные гормоны - это средства экстренной терапии благодаря их противовоспалительному, десенсибилизирующему и противошоковому действию. Кроме того, их применяют в качестве диуретических, анаболических, контрацептивных и противораковых средств. В промышленном производстве стероидных лекарственных препаратов преимущество внедрения биотехнологических методов обусловлено:

• возможностью проведения реакций, практически не осуществимых методами химического анализа;

• превращением субстрата в биологически активное соединение в течение одной стадии процесса (в отличие от многостадийного химического синтеза);

• удобством и экономичностью биотехнологических процессов.

Микробиологические трансформации

Возможность проведения уникальных реакций базируется на использовании микроорганизмов в качестве носителей активных полиферментных систем, способных осуществлять целенаправленные трансформации субстрата. Микробиологические трансформации являются одним из направлений применения биообъектов в многостадийном синтезе лекарственных препаратов. Результат микробиологической трансформации не синтез молекулы *de novo* из компонентов питательной среды, а изменение молекулярной структуры трансформируемого вещества.

Классификацию микробиологических трансформаций осуществляют по типу возникновения или отщепления функциональных групп. К основным видам микробиологических трансформаций

относят окисление, восстановление, декарбоксилирование, дезаминирование, гидролиз, метилирование, этерификацию, дегидрирование, ацетилирование, амидирование, деметоксилирование, изомеризацию и т.д. Перечисление этих процессов показывает широкий спектр реакций, проводимых с помощью ферментативных систем микроорганизмов. Процесс трансформации стероидных соединений - это аэробный

процесс глубинной ферментации. Для его реализации обычно используют типовое оборудование, обеспечивающее интенсивный массообмен.

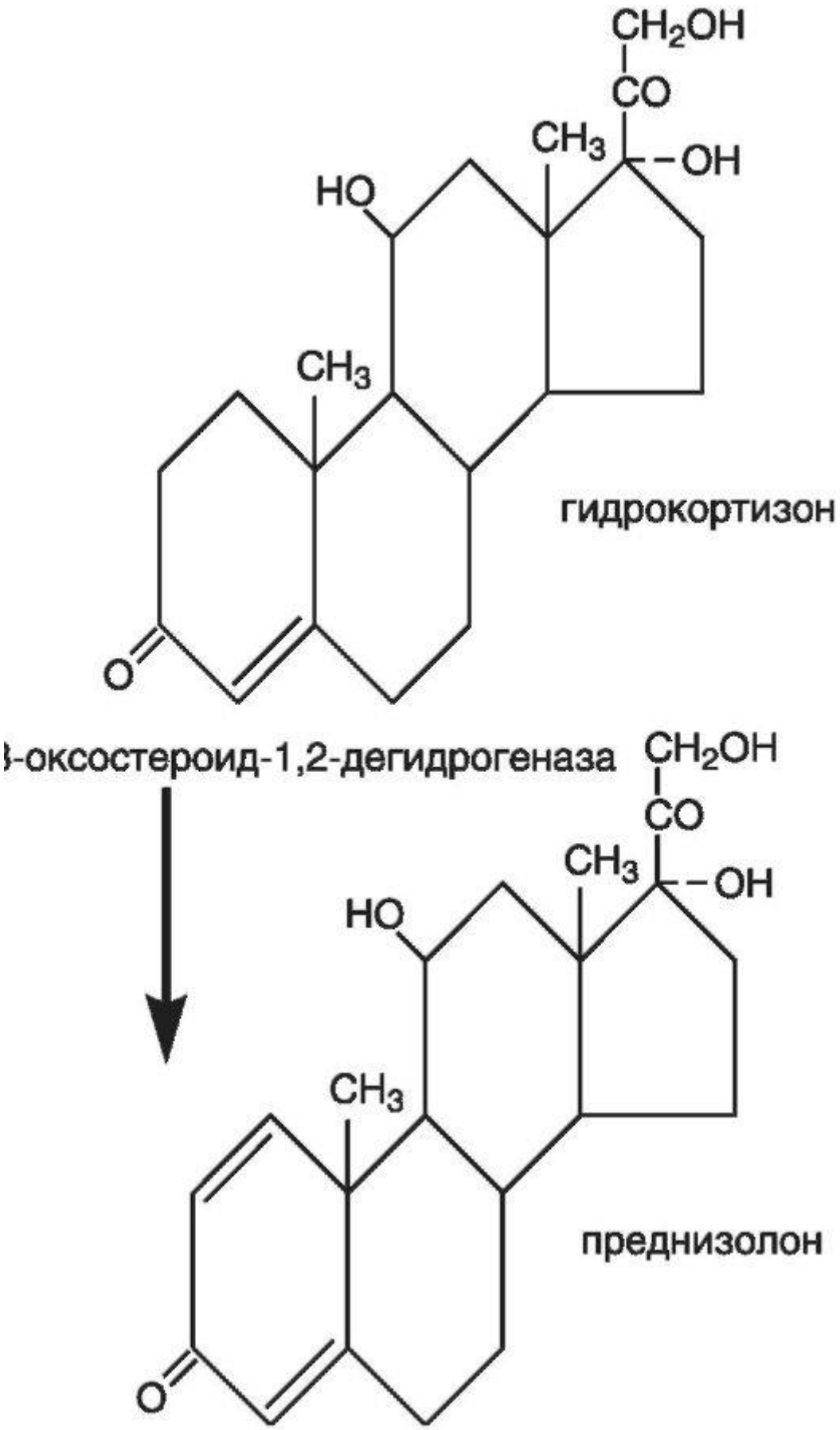


Рис. 6. Трансформация гидрокортизона в преднизолон

Реакции дегидрирования

Среди различных микробиологических трансформаций стероидных соединений реакции дегидрирования придают особое значение, так как введение двойной связи приводит к усилению биологической активности данных соединений. Так, с помощью реакции 1, 2-дегидрирования из гидрокортизона и кортизона получают более эффективный препарат - преднизолон, обладающий лучшими терапевтическими свойствами. В реакции 1, 2-дегидрирования участвует внутриклеточный фермент - 3-оксо- стероид-1, 2-дегидрогеназа, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны. В процессе реакции электроны с фермента переносятся на кислород через дыхательную цепь.

Трансформация гидрокортизона в преднизолон (рис. 6) и потребление кислорода происходят стехиометрически. Кинетика реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Реакции дегидрирования осуществляют бактерии и актиномицеты, особенно часто это представители родов *Arthrobacter, Corynebacterium, Nocardia.* Ферменты данных микроорганизмов - дегидрогеназы - обладают широкой субстратной специфичностью. При этом выход целевых продуктов, образующихся в результате реакции 1, 2-дегидрирования, достигает 85%. Распространенность реакции такого типа связана не только с наличием дегидрогеназ у большого количества микроорганизмов, но и с химической нестабильностью данного участка стероидной молекулы.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: овладеть методом биотрансформации гидрокортизона в преднизолон с использованием клеток *A. globifirmis,* иммобилизованных в ПААГ.

К занятию необходимо знать:

- методику иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ;
- условия биотрансформации гидрокортизона в преднизолон в реакторах разного типа;
- характеристику ферментной системы *Arthrobacter globiformis,* участвующей в 1, 2-дегидрировании.

К занятию необходимо уметь:

- приготовить бактериальную суспензию;
- определить степень биотрансформации гидрокортизона в преднизолон в процентном отношении;
- рассчитать концентрацию преднизолона в анализируемом растворе.

Контрольные вопросы

• Почему диапазон применения стероидных гормонов в практической медицине в последнее время значительно расширился?

• На чем базируется возможность проведения уникальных реакций биотрансформации?

• Приведите классификацию микробиологических трансформаций.

• Почему среди различных микробиологических трансформаций стероидных соединений особое значение придают реакции дегидрирования?

• Что является важным фактором сохранения жизнеспособности клеток и продуктивности их ферментной системы?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Получение стероидных гормонов биотехнологическими методами».

2. Настоящее учебно-методическое пособие.

Дополнительная

1. *Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К.* и др. Инженерная энзимология. - М.: Высшая школа, 1987.

2. *Быков В.А., Крылов А.И., Манаков М.Н.* и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. - М.: Высшая школа, 1987.

Лабораторная работа ? 12 Проведение биотрансформации гидрокортизона в преднизолон с помощью иммобилизованных клеток *A. globiformis*

Цели работы: выбор оптимальных условий биотрансформации гидрокортизона в преднизолон клетками *A. globiformis,* иммобилизованными в ПААГ; выбор оптимальных условий функционирования непрерывно-проточных реакторов для биотрансформации гидрокортизона в преднизолон.

Целевые задачи

• изучение влияния величины pH и температуры на процесс биотрансформации гидрокортизона в преднизолон;

• ознакомление с различными типами непрерывно-проточных реакторов;

• определение степени биотрансформации.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• колбы объемом 20 мл;

- пипетки стеклянные объемом от 5 до 50 мл;
- смесь бензол/ацетон (3:1);
- хлороформ;
- 10 мМ боратный буфер, pH=8,5;
- 10 мМ фосфатный буфер, pH=7,2; pH=6,0;
- гидрокортизон в микрокристаллическом состоянии;
- пластины «Силуфол» (УФ-254);
- гранулы ПААГ с иммобилизованными клетками *A. globiformis. Приборы:*
- термостат;
- качалка;
- газожидкостной анализатор для ВЭЖХ;
- весы аналитические;
- спектрофотометр.

Суть работы

Определение степени биотрансформации гидрокортизона в преднизолон и оценка влияния на этот процесс различных факторов.

Порядок выполнения работы

Часть 1. Определение оптимальных условий процесса биотрансформации гидрокортизона в преднизолон

В колбы объемом 100 мл помещают по 5 мл гранул ПААГ с иммобилизованными клетками *A. globiformis,*прибавляют по 50 мл следующих растворов: 10 мМ фосфатный буфер с pH 7,2 (колбы ? 1, 2, 3), 10 мМ фосфатный буфер с pH 6,0 (колба ? 4) и 10 мМ боратный буфер с pH 8,5 (колба ? 5). Во все колбы добавляют по 20 мг/ мл гидрокортизона в микрокристаллическом состоянии и инкубируют на мешалке при температуре 10 (колба ? 1), 37 (колба ? 2) и 29 °С (колбы ? 3, 4, 5). Через час инкубации отбирают пробы по 5 мл и определяют в них концентрацию преднизолона. Для этого к анализируемым пробам добавляют двойной объем хлороформа. После интенсивного встряхивания хлороформную фазу отбирают. Процедуру повторяют трижды. Растворенный в хлороформе материал объединяют и высушивают под вакуумом. Сухой остаток растворяют в смеси бензол/ацетон (3:1). 10 Мкл раствора наносят на пластины «Силуфол» (УФ-254) и проводят ТСХ в той же системе. После разделения стероидных соединений пластины подсушивают на воздухе и отмечают пятна, флуоресцирующие при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм. Материал, относительная подвижность (Rf)

которого соответствует таковой преднизолона, элюируют в течение 15 мин при встряхивании.

Оптическую плотность элюата измеряют при длине волны 240 нм. Концентрацию преднизолона (С) в анализируемом растворе определяют по формуле:

$$C\,(\%) = \frac{A_{240} \times а \times б}{299 \times в \times 0{,}01} \times 100\,,$$

где A_{240} - оптическая плотность полученного раствора;

299 - оптическая плотность 1% раствора преднизолона при длине

волны 240 нм;

длина кюветы - 1 см;

а - объем ацетон-бензольной смеси (мл), в которой растворен сухой остаток;

б - объем этанола (мл), используемый для элюирования преднизолона после ТСХ;

в - объем пробы, взятой для анализа (мл);

0,01 - объем пробы, нанесенной на пластины для ТСХ.

По результатам работы определяют влияние величины pH и температуры инкубации на скорость протекания процесса биотрансформации.

Часть 2. Определение степени биотрансформации

На рис. 7 представлены два вида непрерывно-проточных реакторов, представляющих собой термостатируемые колонки, заполняемые гранулами геля, содержащими *A. globiformis.* Через колонки с помощью перистальтического насоса подается раствор гидрокортизона (0,1-0,2 мг/мл) в 10 мМ фосфатном буфере. В реактор первого типа подается раствор гидрокортизона в концентрации 0,1 мг/мл, скорость потока геля составляет 2 мл/час. Во втором типе реактора субстрат

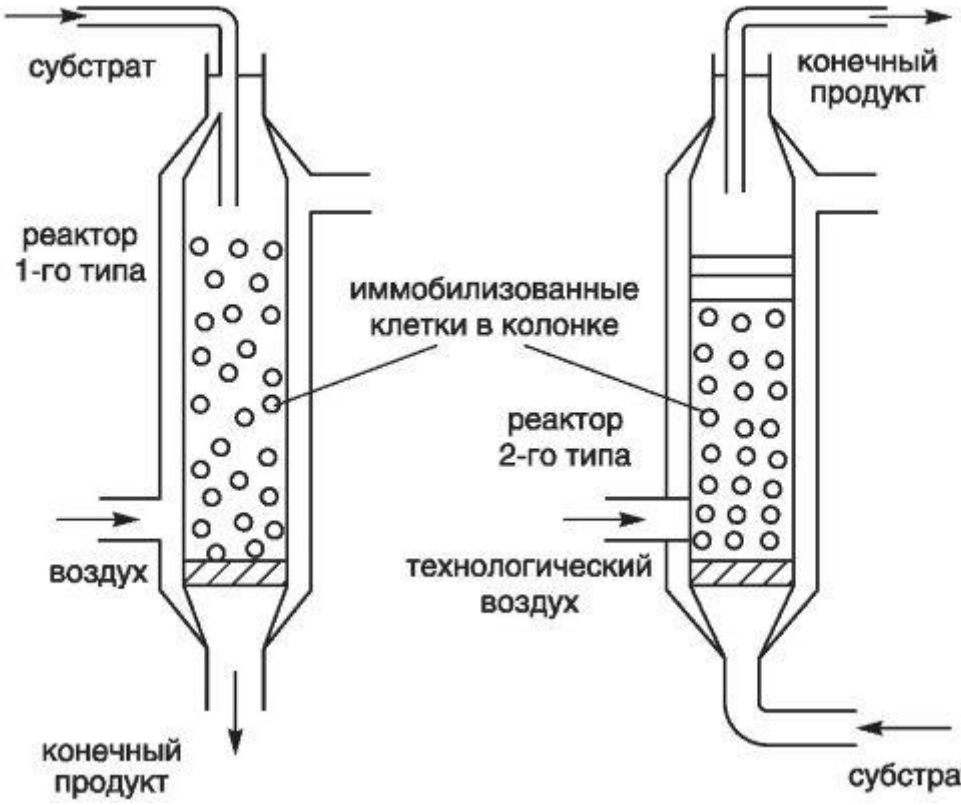


Рис. 7. Реакторы для трансформации стероидных соединений

подается снизу вверх и, кроме того, осуществляется дополнительная аэрация реактора.

Контроль качества образующихся после прохождения реактора продуктов осуществляют путем анализа полученных методом ВЭЖХ хроматограмм растворов. При этом степень биотрансформации определяют по формуле:

$$C = \frac{S_n}{\sum S_i} \times 100 ,$$

где C - степень биотрансформации гидрокортизона в преднизолон в процентном отношении;

S_n - площадь пика, соответствующего преднизолону; $\sum S_i$ - сумма площадей пиков на хроматограмме.

Площадь пика определяют по формуле:

$S_i = h_i * W_i$,

где h_i - высота пика компонента, мм;

W_i- ширина пика на уровне половины его высоты, мм.

Аналогично устанавливают степень биотрансформации при увеличении концентрации субстрата до 0,2 мг/мл при той же скорости потока.

Затем, не меняя концентрации гидрокортизона (0,1 мг/мл), осуществляют увеличение скорости потока до 4 мл/час в 1 мл геля, после чего снова определяют степень биотрансформации.

На основе полученных результатов выбирают оптимальные условия работы реактора.

Контрольные вопросы

• Почему реакция 1, 2-дегидрирования является классическим примером микробиологических трансформаций стероидных гормонов?

• Укажите преимущества использования иммобилизованных клеток в производстве стероидных гормонов.

• Назовите основные методы контроля процесса биотрансформации гидрокортизона в преднизолон.

• Что такое «степень биотрансформации гидрокортизона в преднизолон»?

• Почему для биотрансформации стероидов используют специальные ферментеры?

ГЛАВА 5 ПРОБИОТИКИ

Тема «Пробиотики» посвящена методам микробиологического и биохимического контроля процесса культивирования молочнокислых бактерий, используемых для получения пробиотиков. Описан процесс приготовления питательных сред для учета лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков. Представлены основные методы контроля качества препаратов пробиотиков: микроскопическая идентификация вышеуказанных микроорганизмов, определение концентрации жизнеспособных клеток, определение активной и титруемой кислотности.

Цель изучения темы: научиться осуществлять контроль процесса получения препаратов пробиотиков.

Данная тема представлена одним семинарским занятием, которое включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ.

На занятии выполняется лабораторная работа «Определение концентрации жизнеспособных клеток лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, а также активной и титруемой кислотности культуральной жидкости».

Для лабораторной работы приведены: цели и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 10. ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Введение

Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии. Организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших и грибов. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой. Совокупность микробиоценозов обозначается как «нормобиоценоз» или «эубиоз». Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной резистентности организма. Защитную роль микрофлоры в обеспечении здоровья трудно переоценить. Изменение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания в результате более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера.

Факторы, ведущие к нарушениям в состоянии микрофлоры, весьма многочисленны. Возможно, в связи с этим почти 90% населения нашей страны в той или иной мере страдают дисбактериозами, т.е. микроэкологическими нарушениями. Наиболее распространен дисбактериоз кишечника, причинами которого могут быть тяжелые болезни, интоксикации, нерациональное питание, нарушения иммунной системы. В свою очередь дисбактериоз может служить причиной колитов, холециститов, диатеза, нейродермита, анемии, псориаза, грибковых поражений слизистых оболочек, аллергии.

Широкое применение природных и полусинтетических антибиотиков, ядохимикатов и других продуктов химического синтеза способствует распространению дисбактериозов. Это связано с тем, что указанные соединения подавляют молочнокислые бактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте, и тем самым создают условия для усиленного размножения в нем условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов. Кроме того, дисбактериозы могут возникать при

изменении характера питания и под влиянием различных факторов внешней среды, ведущих к стрессам.

Таким образом, поддержание нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и борьба с дисбактериозами - актуальная задача современной медицины и ветеринарии. Она решается путем создания и применения препаратов на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов - нормофлоров и пробиотиков (или микробиотиков).

Важнейшими компонентами этих препаратов являются молочнокислые бактерии: лактобациллы, бифидобактерии и энтерококки.

Задание для самоподготовки

Цели изучения темы занятия:

• ознакомиться с методами микробиологического и биохимического контроля процесса культивирования молочнокислых бактерий, используемых для получения пробиотиков;

• научиться оценивать качество этих препаратов с помощью данных методов.

К занятию необходимо знать:

• культурально-морфологические особенности различных видов бактерий, используемых в производстве пробиотиков;

• метод серийных разведений;

• методику подсчета количества колоний на чашках (с определенными разведениями) для определения концентрации жизнеспособных клеток в исходной культуре.

К занятию необходимо уметь:

• готовить среды для учета молочнокислых бактерий и разливать их в чашки Петри;

• осуществлять титрование культур молочнокислых бактерий;

• определять активную кислотность потенциометрическим методом.

Контрольные вопросы

• Охарактеризуйте симбиоз человека с микроорганизмами.

• Каково значение микрофлоры желудочно-кишечного тракта для нормальной жизнедеятельности организма человека?

• Перечислите механизмы антагонистического действия молочнокислых бактерий на патогенную и гнилостную микрофлору.

• Почему борьба с дисбактериозами представляет собой актуальную задачу?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Получение препаратов пробиотиков».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. *Прищеп Т.П., Чучалин ВС.* и др. Основы фармацевтической биотехнологии. - Томск: НТЛ, 2006.

2. *Куваева И.Б., Ладодо К.С.* Микроэкологические и иммунные нарушения у детей. - М.: Медицина, 1991.

Лабораторная работа ? 13 Определение концентрации жизнеспособных клеток лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, а также активной и титруемой кислотности культуральной жидкости

Цель работы: освоить методы контроля препаратов пробиотиков.

Целевые задачи

• приготовление питательных сред для учета лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков;

• проведение микроскопического исследования этих культур;

• определение концентрации жизнеспособных клеток;

• определение активной и титруемой кислотности.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• колбы емкостью от 50 до 250 мл;

• бюретки от 0,1 до 1 и от 2 до 25 мл;

• пипетки на 1-5 мл;

• бутылки стеклянные для пищевых жидкостей на 250 мл;

• пробирки;

• чашки Петри;

• воронки;

• стекла предметные;

• петли микробиологические;

• вода дистиллированная;

• 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина;

• 0,1 н раствор гидроокиси натрия;

• глюкоза кристаллическая;

• молоко коровье обезжиренное;

• томатный сок;

- пептон;
- цистеин солянокислый;
- автолизат дрожжей;
- аскорбиновая кислота;
- уксуснокислый натрий;
- агар-агар;
- спиртовой раствор метиленовой сини;
- культуры клеток лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков. *Приборы:*
- термостат любого типа, обеспечивающий температуру нагрева от 28 до 50 °С;
- pH-метр;
- весы лабораторные общего назначения;
- автоклав вертикальный;
- спиртовки лабораторные стеклянные;
- баня водяная любого типа;
- микроскоп.

Суть работы

Идентификация и количественное определение микроорганизмовсимбионтов.

Подготовительный этап

1. Приготовление среды для учета лактобацилл. *Состав среды:*

- глюкоза - 5,0 г;
- томатный сок - 100 мл;
- пептон - 10,0 г;
- автолизат дрожжей - 100 мл;
- цистеин солянокислый - 0,5 г;
- агар-агар - 15 г;
- вода - до 1000 мл.

В колбу емкостью 2000 мл наливают 100 мл дрожжевого автолизата, 100 мл томатного сока, вносят остальные компоненты, доводят питьевой водой до 1000 мл и с помощью 0,1

н NaOH устанавливают pH, равный 6,8-7,0. Среду разливают в колбы по 500 мл и передают на стерилизацию. Стерилизуют в автоклаве при 0,06 МПа в течение 30 мин.

2. Приготовление питательной среды для учета бифидобактерий и энтерококков.

Состав среды:

- мясопептонный бульон - 500 мл;
- пептон - 20,0 г;
- лактоза - 20,0 г;
- уксуснокислый натрий - 6,0 г;
- хлористый натрий - 10,0 г;
- цистеин солянокислый - 0,4 г;
- агар-агар - 15,0 г;
- вода - до 1000 мл.

В колбу наливают 500 мл мясопептонного бульона, добавляют лактозу, пептон, уксуснокислый натрий, хлористый натрий, цистеин, тщательно перемешивают до полного растворения солей, устанавливают pH 6,8-7,0. Среду разливают в колбы по 300 мл, добавляют 4,5 г агара и стерилизуют в автоклаве при 0,06 МПа в течение 20 мин.

Порядок выполнения работы

1. Микроскопическое исследование.

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят исследуемый материал из культуральной жидкости. Препараты высушивают при комнатной температуре; для ускорения высыхания предметное стекло захватывают между большим и указательным пальцем мазком вверх и осторожно прогревают над пламенем горелки. Приготовленные таким образом мазки окрашивают спиртовым раствором метиленовой сини. Преимущество метиленовой сини в данном случае заключается в том, что она слабо окрашивает основной фон. Раствор метиленовой сини готовят на 96% спирте с добавлением 1% раствора щелочи.

- Под микроскопом при иммерсионном увеличении культуры лактобацилл выглядят как хорошо окрашенные крупные палочки, соединенные в цепочки по 3-4 клетки.
- Культура энтерококка под микроскопом представлена кокками, расположенными попарно или в виде цепочек, хорошо окрашенных метиленовой синью.
- Культура бифидобактерий под микроскопом представлена либо в виде ветвящихся клеток, либо в виде булавовидных и веретенообразных форм.

2. Определение концентрации жизнеспособных клеток.

В градуированную пипетку набирают 1,0 мл культуральной жидкости и вносят в бутылку со 100 мл стерильной воды. Тщательно взбалтывают и после этого совершают ряд последовательных раз-

ведений. Для этого 1 мл из приготовленной суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды (так получают разведение 10^{-3}).

Для каждого последующего разведения необходимо применять отдельные стерильные пипетки. Методом серийных разведений готовят разведения 10^{-7} и 10^{-8}. Из этих разведений берут стерильной пипеткой 1 мл суспензии и переносят в чашку Петри, готовят по 3 чашки на каждое разведение. В каждую чашку стерильно заливают расплавленные и охлажденные до 45 °С среды учета, приготовленные заранее. Легким покачиванием чашки тщательно смешивают питательную среду с суспензией. После застывания чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при 37-39 °С на 48 ч. Каждая чашка должна быть подписана: степень разведения, номер культуры, дата. Учет выросших колоний производят через 2 сут. Для подсчета отбирают чашки, где количество колоний не менее 50. На плотных питательных средах учета молочнокислые бактерии, вырастая, образуют следующие типы колоний:

• бифидобактерии образуют гладкие колонии или колонии в виде чечевичек в толще агара;

• лактобациллы - в виде комочков ваты, гладкие формы образуются редко;

• энтерококки - круглые поверхностные или лодочковидные колонии в толще агара.

3. Определение активной и титруемой кислотности.

Активная кислотность определяется потенциометрическим методом. В конце ферментации pH культуральной жидкости варьирует от 3,9 до 4,5 в зависимости от вида бактерий-симбионтов.

Титруемую кислотность устанавливают путем титрования 10 мл культуральной жидкости, разбавленной 1:1 дистиллированной водой в присутствии 2-3 капель раствора фенолфталеина, 0,1 н раствором NaOH. Обычно она составляет (в градусах Тернера) для суточных культур:

ацидофильной палочки - 180-200;

• бифидобактерий - 140;

• энтерококков - 100.

По окончании данного занятия студенты оформляют протокол с описанием морфологии исследованных под микроскопом бактерий, определением концентрации жизнеспособных клеток, а также активной и титруемой кислотности культуральной жидкости.

Контрольные вопросы

• Назовите штаммы бактерий, используемые для получения препаратов пробиотиков.

• Перечислите параметры, контролируемые в процессе культивирования молочнокислых бактерий.

• Расскажите об условиях хранения препаратов на основе живых молочнокислых бактерий.

• Приведите различия между отдельными видами молочнокислых бактерий, наблюдаемыми под микроскопом.

• Какие типы симбиоза вы знаете?

• Каковы причины дисбактериоза?

ГЛАВА 6 БИОПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ема «Биопрепараты растительного происхождения» посвящена изучению основ методологии выращивания изолированных тканевых и клеточных культур для получения широкого спектра БАВ. Представлены базовые методы анализа культуры растительных клеток: определение влажности биомассы культуры тканей и содержания общей золы, определение экстрактивных веществ и суммарной гликозидной фракции, испытание на подлинность, качественные реакции на специфические вещества, гликозиды и крахмал.

Цель изучения темы: ознакомление с технологией получения растительного сырья *in vitro,* а также с методами оценки подлинности и качества сырья.

Данная тема представлена одним семинарским занятием, которое включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторной работы.

На занятии выполняется лабораторная работа «Получение каллусной культуры клеток и оценка ее качества».

Для лабораторной работы приведены: цель и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 11. ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ *IN VITRO*

Введение

Растения - ценный источник БАВ, использующийся в фармацевтической, медицинской, пищевой и других отраслях промышленности. Однако в настоящее время запасы экономически важных лекарственных растений уменьшаются. Их плантационное выращивание зачастую нерентабельно. Решение этой проблемы было найдено в выращивании изолированных тканевых и клеточных культур, способных синтезировать широкий спектр веществ - вторичных метаболитов: алкалоидов, терпенов, гликозидов, полифенолов и др. Промышленный способ выращивания изолированных культур дает возможность за короткий срок (30-45 сут) получать большой объем ценного лекарственного сырья. Любая из вышеназванных технологий начинается с процесса получения культуры каллусной ткани, состоящей из сообщества клеток, выращиваемых на искусственной питательной среде. Каллус (от лат. *callus* - толстая кожа, мозоль) - ткань, образующаяся в местах повреждения органов растения и обычно возникающая при неорганизованной пролиферации клеток растений. Используется для получения изолированных тканей и клеток растений. Изолированные культуры каллусов могут быть получены из различных органов растений (корни, побеги, листья) или из определенного типа клеток (эндосперм, пыльца). Выбранный эксплантант должен находиться в подходящем «биологическом» состоянии, необходимом для получения каллусных культур. Также изолированные культуры растительных клеток можно применять для биотрансформации. В отличие от синтеза БАВ культурой клеток растений при биотрансформации неспособная к синтезу БАВ культура с помощью локализованных в клетке ферментов, изменяя функциональные группы добавленных извне предшественников, превращает их в вещества, синтез которых нарушен. Биотрансформации подвергаются стероиды, терпеноиды, алкалоиды, кумарины. Пример, иллюстрирующий, как с помощью биотрансформации можно повысить активность вещества, - превращение дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis Lanata* (рис. 8). Дигитоксин и дигоксин относятся к группе стероидов, их используют в клинической практике для

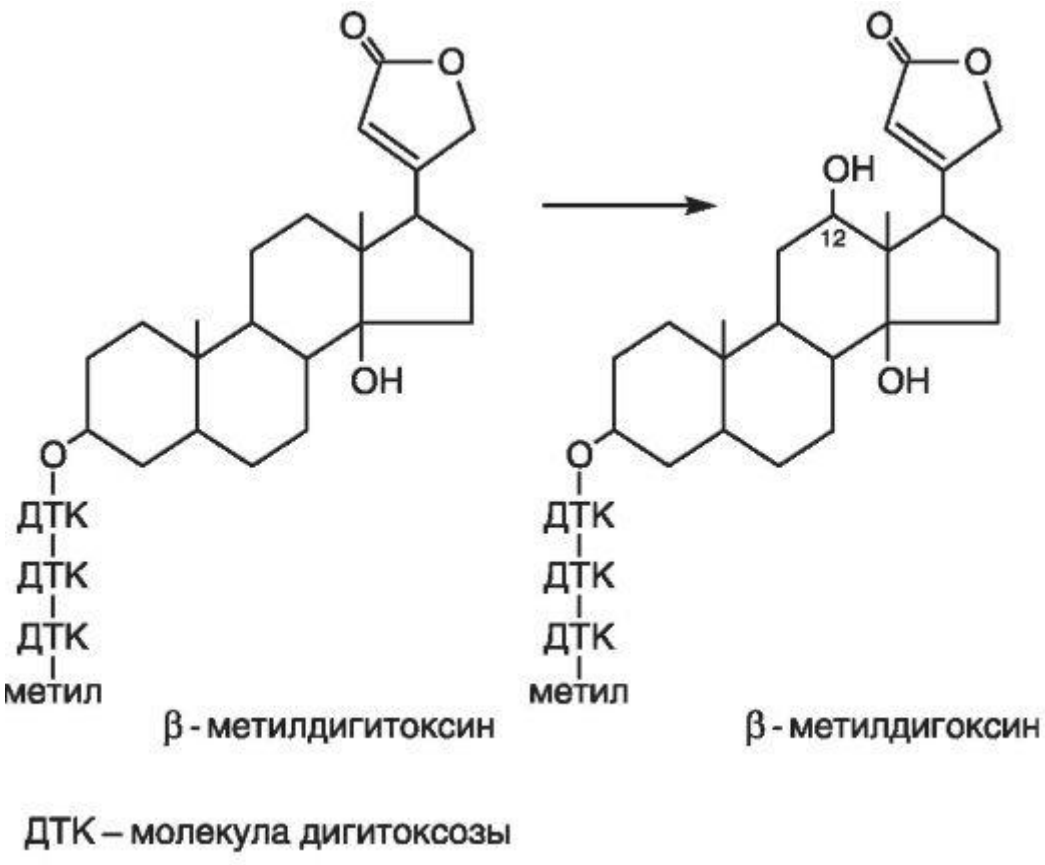


Рис. 8. Биотрансформация дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis Lanata*

лечения хронических заболеваний сердца. При экстрагировании из растительного сырья в основном выделяется более токсичное вещество дигитоксин, тогда как дигоксина выделяется крайне мало. Увеличения количества дигоксина можно достигнуть при помощи биотрансформации из дигитоксина за счет гидроксилирования последнего при участии фермента, локализованного в клетках культуры *Digitalis Lanata.* В условиях промышленного производства эти клетки выращивают на обычной среде в ферментере в течение 5 дней. По окончании указанного срока в среду культивирования вводят β-метилдигитоксин - менее активное производное дигитоксина (дигитоксин химическим путем метилируют в β-метилдигитоксин) и через 2 нед культивирования получают дигоксин. В нашей стране разработаны и внедрены в промышленное производство технологии получения БАВ из биомассы женьшеня и родиолы розовой. В Японии выведен на поток процесс производства пигмента и антибактериального агента шиконина[р] с использованием культуры воробейника. Препаратами из культур тканей родиолы розовой и женьшеня являются галеновые препараты - 20 или 40% водно-спиртовые экс-

тракты. 20% препарат применяют в косметике, пищевой промышленности, 40% препарат - в медицине. В препаратах наряду с фармакологически активными веществами присутствуют сопутствующие вещества (углеводы, белки, витамины, липиды), которые влияют на проявление действующего начала. Действующим началом препаратов женьшеня являются панаксозиды - тетрациклические тритерпены даммаранового ряда. Родиола розовая содержит фенольные соединения, производные кумарового спирта,

кумаровой кислоты. В медицине эти препараты используют как тонизирующие средства, которые снимают усталость, повышают работоспособность, создают в организме состояние повышенной неспецифической сопротивляемости, укрепляют иммунную систему. Установлены противоопухолевый эффект препаратов, антитоксическое действие, выражены противовоспалительные свойства (на этом основано их применение в косметике - усиливается регенерация тканей). Действие препаратов из биомассы более мягкое, чем у аналогичных из природного корня. Доза (терапевтическая) для получения лечебного эффекта у препаратов из биомассы в 2 раза выше, чем у препаратов из корня. Содержание суммарной гликозидной фракции в биомассе составляет не менее 1,5; в препарате - 0,12-0,24%.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия:

• научиться получать биомассу растений на примере женьшеня, изучив морфофизиологические и химические параметры клеток;

• освоить методы анализа культуры клеток. К занятию необходимо знать:

• основы каллусогенеза;

• особенности строения растительных клеток;

• методы культивирования культур растительных клеток. К занятию необходимо уметь:

• работать с микроскопом и аналитическими весами;

• готовить растительный материал для получения первичного каллуса;

• приготовить питательную среду для получения биомассы;

• провести выращивание биомассы;

• приготовить временный препарат клеточной культуры женьшеня для изучения его под микроскопом;

• провести ТСХ.

Контрольные вопросы

• Назовите методы селекции, используемые в культуре тканей и клеток растений.

• Почему явление тотипотентности растительных клеток имеет очень большое значение при получении БАВ из растительного сырья?

• Приведите преимущества растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток, перед сырьем из плантационных или дикорастущих растений.

• Какие методы стерилизации растительных клеток вам известны?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Биопрепараты растительного происхождения».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. Биотехнология сельскохозяйственных растений / под ред. С. Монтеля - М.: Мир, 1987.

2. Биотехнология растений: культура клеток / под ред. Дж. Диксона - М.: Мир, 1989.

Лабораторная работа ? 14 Получение каллусной культуры клеток и оценка ее качества

Цель работы: освоить технологию получения растительного сырья *in vitro* и методы его идентификации.

Целевые задачи

- получение первичного каллуса;
- определение митотического индекса;
- определение экстрактивных веществ;
- проведение качественных реакций на гликозиды, стероидные соединения, крахмал.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

- клеточная культура женьшеня;
- раствор 45% уксусной кислоты;
- 40, 70, 96% этиловый спирт;
- раствор ацетокармина;
- петролейный эфир;
- хлороформ;
- н-бутиловый спирт;
- раствор Люголя;
- насыщенный раствор треххлористой сурьмы;
- концентрированный раствор аммиака;
- круглодонная колба;
- коническая колба;

- сухой фильтр;
- стекла предметные;
- петли микробиологические;
- тигель;
- делительная воронка;
- пластинки «Силуфол». *Приборы:*
- сушильный шкаф;
- бюксы;
- весы аналитические;
- эксикатор;
- обратный холодильник;
- электрическая плитка;
- микроскоп;
- магнитная мешалка;
- центрифуга;
- муфельная печь;
- хроматографическая камера.

Суть работы

Оценка подлинности и качества растительного сырья.

Подготовительный этап

1. Получение первичного каллуса.

Растительный материал тщательно моют, стерилизуют гипохлоридом натрия, 96% спиртом или 0,1% раствором сулемы, затем тщательно промывают дистиллированной водой. Вырезают маленькие кусочки растительной ткани (эксплантант) размером 2-4 мм и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду. Сосуды закрывают ватно-марлевыми пробками. Необходимо соблюдать строгие правила асептики (работать в боксах). Для образования каллуса

и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где строго поддерживают определенный режим: температуру и влажность воздуха. Для большинства культур эти

параметры следующие: +24-26 °С и влажность 65-70%. Через 2-3 нед на раневой поверхности образуется первичный каллус.

2. Технология получения растительного сырья *in vitro*. Образовавшийся первичный каллус отделяют от эксплантанта и

пересаживают на свежую питательную среду определенного состава (твердую или жидкую), поддерживая таким образом рост ткани. Цикл культивирования варьирует от 14 до 30 сут. За это время объем биомассы увеличивается в 15-20 раз, а клетки синтезируют вещества вторичного происхождения.

Технология получения биомассы состоит из следующих стадий:

- приготовление оборудования;
- приготовление питательной среды;
- стерилизация питательной среды;
- посев ткани на питательную среду;
- выращивание биомассы;
- съем сырой биомассы и высушивание.

Среда культивирования должна содержать следующие компоненты:

- Макроэлементы (лучшей формой азотного питания являются нитраты калия или аммония, а также фосфор, сера, кальций, сульфаты).
- Микроэлементы (цинк, марганец, алюминий, медь и др.).
- Источники железа.
- Органические добавки (витамины B_1, B_2, B_6, кальция пантотенат, никотиновая кислота и др.).
- Источник углерода (лучший источник углеводного питания - 2-5% сахароза, реже используют глюкозу или другие сахара).
- Фитогормоны (регуляторы роста растений) - ауксины (регулируют рост и дифференцировку клеток) и цитокинины (индуцируют клеточное деление).

Культивирование проводят на твердых и жидких питательных средах.

3. Приготовление временного препарата клеточной культуры (женьшеня, родиолы розовой, унгернии, стевии).

Небольшие кусочки (1-2 мм) исследуемого объекта помещают в фиксатор, который способствует прижизненному сохранению всех

компонентов клетки. Для клеточных культур применяют смесь одной части ледяной уксусной кислоты и трех частей 96% этилового спирта. Объем фиксатора должен быть в 5-6 раз больше объема фиксируемого материала. Время фиксации - 6-12 ч. После процедуры фиксации исследуемый объект переносят в раствор ацетокармина или ацетоарсеина и оставляют на сутки. Все последующие препаровальные работы проводят на предметном стекле в капле хлоралгидрата или 45% уксусной кислоты. В каплю хлоралгидрата помещают объект и накрывают его покровным стеклом. Для получения монослоя клеток слегка расплющивают кусочки ткани, надавливая препаровальной иглой на покровное стекло. Далее легким постукиванием добиваются расхождения клеток. Следующий этап - распластывание клеток между покровным и предметным стеклом. Покровное стекло покрывают фильтровальной бумагой, производят надавливание, а затем круговые вращения обратной стороной иглы, начиная от центра, к периферии препарата. Эта процедура способствует распластыванию клеток и хорошему разбросу хромосом. Важно, чтобы покровное стекло не двигалось, в противном случае клетки слипаются и разрушаются. Приготовленный препарат просматривают под микроскопом.

В тигель, предварительно доведенный до постоянного веса, помещают навеску (1 г) и взвешивают с точностью до 0,002 г. Тигель с навеской ставят на электрическую плитку и обугливают материал под тягой. После прекращения выделения дыма тигель переносят в муфельную печь и прокаливают при температуре 550-600 °С. Через 1,5-2 ч тигель вынимают и помещают в эксикатор. Через 1-1,5 ч тигель с золой взвешивают на аналитических весах. Прокаливание необходимо повторить, поместив тигель в муфельную печь на 20-30 мин. При достижении постоянного веса рассчитывают процентное содержание золы в воздушно-сухой (А) и абсолютно сухой навесках ($А_1$) по формулам:

$$А = \frac{(б - в) \times 100}{б - а},$$

$$А_1 = \frac{а \times 100}{100 - n},$$

где (б - а) - вес воздушно-сухого материала;

(б - в) - вес золы;

а - вес пустого тигеля;

б - вес тигеля с воздушно-сухой навеской; в - вес тигеля с золой после прокаливания; n - влажность сырья.

4. Определение содержания суммарной гликозидной фракции (СГФ).

Аналитическую пробу (сухая биомасса) измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 3,0 г (точная навеска) порошка биомассы помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 60 мл 70% этилового спирта и перемешивают на магнитной мешалке в течение 2 ч при нагревании до температуры 40 -45 °С. Смесь центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 3000 об/мин. Раствор декантируют, твердый осадок вновь переносят в коническую колбу и извлекают в течение часа, после чего смесь опять центрифугируют. Операцию повторяют 3 раза. Извлечения объединяют и упаривают под вакуумом при температуре 55 °С. К остатку по частям добавляют 50 мл воды, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Раствор декантируют, переносят в делительную воронку, обрабатывают петролейным эфиром (температура кипения - 40-70 °С) 3 раза порциями по 25 мл, сливая водный раствор в колбу. Полученный раствор количественно переносят в ту же делительную воронку и обрабатывают хлороформом 3 раза порциями по 25 мл. После всех процедур гликозидную фракцию экстрагируют н-бутиловым спиртом (25 мл), центрифугируют и отделяют верхний слой. Извлечение повторяют 5 раз. Полученные извлечения объединяют, промывают 25 мл воды, затем по частям переносят в предварительно взвешенную (с погрешностью ±0,0002 г) круглодонную колбу вместимостью 100 мл и растворитель упаривают под вакуумом при температуре не выше 55 °С. Остаток в колбе высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Колбу с остатком взвешивают с погрешностью ±0,002 г.

Содержание суммы гликозидов в процентном отношении (в пересчете на абсолютно сухое сырье) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{m \times (100 - w)},$$

где m - навеска биомассы, г;

m_1 - масса пустой колбы, г;

m_2 - масса колбы с остатком, г;

w - потеря в массе при высушивании, %.

5. Качественная реакция на гликозиды.

ТСХ проводят с остатком, полученным после количественного определения суммы гликозидов. Остаток взвешивают и растворяют в 70% этиловом спирте из расчета 1 г вещества на 10 мл растворителя. 0,005 мл полученного раствора микропипеткой наносят на линию старта пластинки «Силуфол» размером 10 * 3 см. Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 15 мин, а затем помещают в камеру со смесью н-бутилового спирта, 95% спирта и концентрированного раствора аммиака в соотношении 9:2:5 по объему и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителя дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры и сушат на воздухе в течение 15 мин, после чего снова помещают в камеру с той же смесью растворителей и вторично хроматографируют. Когда фронт растворителя дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 15 мин, опрыскивают из пульверизатора 5% раствором серной кислоты и выдерживают в токе горячего воздуха до проявления. На хроматограмме должно быть заметно не менее четырех пятен - от светло-сиреневого до фиолетового цвета в области Rf от 0,26 до 0,43.

6. Испытание на подлинность. *Приготовление реактива*

В ледяную уксусную кислоту добавляют треххлористую сурьму до насыщения. Раствор в процессе его приготовления необходимо встряхивать, так как растворение идет довольно медленно. Кусочки ткани размером 2-3 мм смачивают дистиллированной водой и помещают в пары аммиака. Затем их обезвоживают ледяной уксусной кислотой до тех пор, пока кусочки ткани не перестанут всплывать в кислоте (от 3 до 5 раз). Далее препарат помещают в насыщенный раствор треххлористой сурьмы и выдерживают в течение 20-30 мин в сушильном шкафу при температуре 80-95 °С. Стероидные соединения окрашиваются в сиреневый цвет.

7. Реакция на крахмал.

На предметное стекло помещают растертую ткань, на которую наносят каплю воды. При исследовании под микроскопом видны разбухшие крахмальные зерна: простые, округлой формы, без видимой слоистости. Крахмалообразующий центр занимает центральное положение и на препаратах имеет вид точки или узкой щели. Часто отдельные зерна крахмала собраны в агрегаты различной величины. Если на препарат нанести каплю раствора Люголя, то крахмал окрашивается в коричнево-фиолетовый цвет.

8. Реакция на специфические вещества.

Растертую ткань помещают на предметное стекло, наносят 1 каплю H_2S0_4 и подогревают, не доводя до кипения. Через 1-2 мин проявляется кирпично-красное окрашивание, переходящее в краснофиолетовое, что говорит о присутствии в ткани панаксозидов.

Контрольные вопросы

- Из каких стадий состоит технология получения биомассы?
- Какие компоненты должна содержать среда культивирования?

• Приведите основные характеристики растительных клеток.

• Какие причины ограничивают применение культур растительных клеток в фармацевтической промышленности?

• Расскажите об основных методах культивирования изолированных клеток и тканей.

• Почему фитогормоны являются обязательными компонентами питательных сред?

ГЛАВА 7 ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИООБЪЕКТЫ (КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ)

Тема «Иммобилизованные биообъекты (культуры клеток и индивидуальные ферменты)» посвящена методам иммобилизации ферментов при получении ЛС из различного исходного сырья. Представлены методы иммобилизации, используемые при промышленном получении некоторых антибиотиков и стероидных лекарственных препаратов.

Цель изучения темы: ознакомление с методами иммобилизации клеток биообъектов, являющихся продуцентами, используемыми в производстве ферментов; определение ферментативной активности иммобилизованных клеток и влияния на нее различных факторов.

Данная тема представлена двумя семинарскими занятиями, каждое из которых включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическим занятиям, описание проведения лабораторных работ.

На первом занятии выполняется лабораторная работа «Иммобилизация клеток *E. coli* - продуцента пенициллинацилазы - и получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) путем гидролиза бензилпенициллина иммобилизованными клетками». На втором - «Изучение влияния условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток».

Для каждой лабораторной работы приведены: цели и задачи, материальное обеспечение, суть работы, методика выполнения и контрольные вопросы.

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 12. ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК *E. COLI* - ПРОДУЦЕНТА ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ - И ПОЛУЧЕНИЕ 6-АМИНОПЕНИЦИЛЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ ПУТЕМ ГИДРОЛИЗА БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА

ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ

Введение

В биотехнологическом производстве все чаще применяют катализ с использованием иммобилизованных ферментов. Ферментативный катализ имеет большое значение для модификации БАВ с целью получения новых ЛС с улучшенными терапевтическими и фармакологическими свойствами. Применение ферментов в процессах трансформации обусловлено высокой специфичностью их биологического действия, связанной со способностью направленно изменять структуру того или иного соединения.

При иммобилизации ферментов (их фиксации на нерастворимом носителе) повышается стабильность и создается возможность многократного использования ферментов. Использование иммобилизованных ферментов имеет и экологические преимущества, так как целевой продукт выделяется из менее сложной гетерогенной реакционной смеси.

Во многих случаях необязательно иммобилизовать изолированный фермент. Иммобилизации могут подвергаться целые микробные клетки, содержащие нужный фермент. При этом еще более повышается стабильность фермента и улучшаются экономические показатели производства.

В области синтеза антибиотиков широкое применение нашла группа ферментов, катализирующих гидролиз ацильных связей у природных антибиотиков группы пенициллина, пенициллинаминогидролазы или пенициллинацилазы. Главным продуктом такого гидролиза является 6-аминопенициллановая кислота - исходный ключевой продукт для синтеза различных полусинтетических пенициллинов (ампициллина, оксациллина, карбенициллина и др.). Основной путь при получении 6-АПК - процесс гидролиза биосинтетического бензилпенициллина ферментом пенициллина-

цилазой, образуемой некоторыми штаммами кишечной палочки. Иммобилизация клеток *E. coli* с помощью включения их в ячейки альгинатного геля и применение такой формы биологического катализатора в производстве позволили повысить производительность процесса получения 6-АПК из бензилпенициллина и в конечном счете увеличить выпуск создаваемых на ее основе полусинтетических пенициллинов.

ИЗадание для самоподготовки

Цель изучения темы: освоить методы иммобилизации клеток биообъектов, являющихся продуцентами, используемыми в производстве ферментов.

К занятию необходимо знать:

- методы иммобилизации отдельных ферментов и клеток;
- характеристику альгината кальция - носителя для иммобилизации целых клеток;
- общую схему определения каталитической активности иммобилизованных ферментов.

К занятию необходимо уметь:

- готовить гель альгината кальция;

• составлять реакционные смеси;

• определять содержание 6-АПК спектрофотометрическим методом;

• провести расчеты активности фермента.

Контрольные вопросы

• Дайте определение понятия иммобилизации биообъектов.

• Каким образом биообъект может быть связан с нерастворимым носителем?

• Какие типы нерастворимых носителей вы знаете?

• Каковы преимущества метода иммобилизации биообъектов при получении лекарственных веществ?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Инженерная энзимология».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. Иммобилизованные клетки и ферменты: пер. с англ. / под ред. Дж. Вудворда. - М.: Мир, 1988.

Лабораторная работа ? 15 Иммобилизация клеток *E.coli* - продуцента пенициллинацилазы и получение 6-аминопенициллановой кислоты путем гидролиза бензилпенициллина иммобилизованными клетками Цели работы: ознакомление с методами иммобилизации ферментов и клеток и определение ферментативной активности иммобилизованных клеток.

Целевые задачи

- приготовление геля альгината кальция;

- иммобилизация в твердом носителе клеток *E. coli,* продуцирующих пенициллинацилазу;

- качественное и количественное определение 6-АПК, образовавшейся из бензилпенициллина.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• микропипетка;

• пробирки стерильные объемом 20 мл;

• пипетка на 5-10 мл с диаметром выходного отверстия 1,5-2 мм;

- шприц на 10 мл с иглой диаметром 1 мм;
- раствор альгината натрия в воде (4%);
- гидрохлорид кальция или глюконат кальция (0,2 М раствор);
- 3,5% раствор бензилпенициллина (калиевая или натриевая соль) в 0,01 М фосфатном буфере с pH=7,8;
- 5% раствор п-диметиламинобензальдегида в 20% растворе уксусной кислоты в этиловом спирте (раствор должен быть свежеприготовленным, о чем можно судить по отсутствию окрашивания или слабо-желтому окрашиванию);
- 18-20-часовая культура клеток *E. coli,* из которой готовят суспензию в изотоническом растворе хлорида натрия (2x108 клеток в 1 мл).

Приборы:

- термостат;
- качалка;
- роторный испаритель;
- весы аналитические;
- микроскоп;
- спектрофотометр.

Суть работы

Иммобилизация клеток *E. coli* и получение 6-АПК.

Порядок выполнения работы Часть 1. Получение (формирование) геля альгината кальция с инкапсулированными в ячейки геля клетками *E. coli*

Характеристика альгината кальция - носителя для иммобилизации целых клеток

Альгинат - основной структурный полисахарид бурых морских водорослей, состоит из остатков маннопиранозилуроната и гулопиранозилуроната. В присутствии моновалентных катионов полисахариды образуют вязкие растворы. В присутствии двухвалентных катионов, особенно ионов кальция, происходит образование геля. В получаемый гель могут быть инкапсулированы (иммобилизованы) целые клетки продуцента или фермент, катализирующий реакцию трансформации субстрата. При использовании альгината необходимо, чтобы в системе отсутствовали или содержались лишь в незначительном количестве хелатирующие агенты (фосфаты, цитраты), которые могут разрушить структуру геля за счет связывания с ионами Ca^{++}.

В пробирке к 2 мл альгината натрия добавляют 2 мл суспензии клеток *E. coli* (т.е. в равных соотношениях по объему) и тщательно перемешивают. К полученной смеси добавляют 15 мл раствора гидрохлорида (или глюконата) кальция. При этом происходит замещение Na+ на Ca++ в альгинате, в результате чего последний перестает быть водорастворимым и формирует гель. Клетки *E. coli* оказываются включенными в ячейки геля, т.е. иммобилизованными в альгинате кальция.

Часть 2. Гидролиз бензилпенициллина иммобилизованными клетками E. *coli,* образующими пенициллинацилазу

В пробирку с гелем альгината кальция с иммобилизованными клетками E. *coli* добавляют 3,5% раствор бензилпенициллина в 0,01 М фосфатном буфере. Смесь инкубируют при 40 °С в течение 20-25 мин. Затем отделяют гель альгината кальция от супернатанта фильтрованием или центрифугированием. В полученный фильтрат добавляют 1 мл раствора п-диметиламинобензальдегида для качественного и количественного определения образовавшейся 6-АПК. При взаимодействии 6-АПК с п-диметиламинобензальдегидом за счет освободившейся в результате гидролиза молекулы бензилпени-

циллина аминогруппы наблюдают ярко-желтое окрашивание (качественная реакция).

Количественное определение образовавшейся 6-АПК осуществляют на спектрофотометре при длине волны 410 нм. Для расчета активности пенициллинацилазы (мкМ 6-АПК/мл в 1 ч) используют формулу:

$$\Phi = \frac{К \times Д\ 410 \times 2 \times Р}{216 \times а},$$

где Ф - активность пенициллинацилазы; К - калибровочный коэффициент;

Д 410 - оптическая плотность анализируемого материала;

Р - разведение раствора 6-АПК перед спектрофотометрированием;

а - объем суспензии клеток, взятой на инкубацию, в мл;

216 - мкмоль 6-АПК, мкг;

2 - коэффициент при расчете количества 6-АПК, освобожденного ферментом в течение 1 ч.

В качестве контроля служит пробирка, в которую к той же, что и в опытной пробирке, реакционной смеси (альгинат натрия + суспензия клеток *E. coli* + глюконат кальция) добавляют 0,3 мл концентрированной ортофосфорной кислоты для остановки ферментативной реакции, после чего приливают 1 мл 3,5% раствора бензилпенициллина в

0,01 М фосфатном буфере. Последующее добавление 1 капли п-диметиламинобензальдегида не обнаруживает наличия 6-АПК (не отмечается ярко-желтого окрашивания реакционной смеси).

Контрольные вопросы

• Какова роль пенициллинацилазы в процессе получения 6-АПК - ядра молекулы всех пенициллинов?

• Как можно определить каталитическую активность иммобилизованной пенициллинацилазы?

• Каким образом можно контролировать протекание ферментативной реакции?

• На чем основаны классификации ферментов-ацилаз?

• Почему при использовании альгината необходимо, чтобы в системе отсутствовали фосфаты и цитраты?

• Какие существуют преимущества и недостатки у носителей органической природы по сравнению с неорганическими?

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 13.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ

НА ПРОДУКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

Введение

Известно, что при иммобилизации водорастворимый фермент переходит в нерастворимую форму, превращаясь таким образом из гомогенного катализатора в гетерогенный. В результате этого превращения катализатор приобретает принципиально новые свойства. Ферменты проявляют крайне высокую лабильность к различным факторам окружающей среды, в частности к температуре и значениям pH. Они быстро инактивируются и выделяются из организма, а также в некоторых случаях проявляют антигенные свойства чужеродных организму белков. В значительной мере все эти недостатки могут быть устранены при использовании ферментов в иммобилизованном виде. Существует несколько методов повышения стабильности ферментов, т.е. их иммобилизации, например адсорбция на нерастворимом носителе с помощью ковалентного связывания, включение в гель, микрокапсулирование и т.д. Однако нужно иметь в виду, что ни один из существующих методов иммобилизации ферментов не является универсальным. Все методы иммобилизации проводят в строго асептических условиях. Получение высокоочищенных эндоферментов - высокозатратный процесс, поэтому обычно стремятся не выделять их из клеток, а использовать в иммобилизованном виде нативные клетки, способные осуществлять желаемые каталитические функции. Так, иммобилизованные клетки бактерий и грибов способны синтезировать соответствующие антибиотики. С помощью иммобилизации растительных клеток можно решать проблемы, связанные и

использованием культур растительных тканей для получения сложных органических соединений. Иммобилизованные клетки используют при трансформации стероидных соединений, так как некоторые стероидформирующие ферменты, особенно гидроксилазы и дегидрогеназы, это крайне лабильные белки.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы: научиться подбирать оптимальные условия иммобилизации.

К занятию необходимо знать:

- методику иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ;
- характеристику ПААГ-носителя для иммобилизации целых клеток;
- преимущества использования иммобилизованных клеток для биотрансформации стероидных гормонов.

К занятию необходимо уметь:

- готовить ПААГ;
- составлять реакционные смеси;
- измерять оптическую плотность элюата;
- провести расчеты удельной активности фермента.

Контрольные вопросы

- Какими свойствами должен обладать носитель при иммобилизации ферментов?
- В чем суть метода включения ферментов в липосомы?
- Какие методы иммобилизации клеток микроорганизмов вы знаете?
- В каких случаях иммобилизация целых клеток-продуцентов лекарственных веществ нерациональна?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Инженерная энзимология».

2. Настоящее учебно-методическое пособие.

Дополнительная

1. Иммобилизованные клетки и ферменты: пер. с англ. / под ред. Дж. Вудворда. - М.: Мир, 1988.

Лабораторная работа ? 16 Изучение влияния условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток

Цель работы: ознакомление с методами и условиями иммобилизации живых микробных клеток и определение ферментативной активности гелей, полученных иммобилизацией *Absidia globiformis.*

Целевые задачи

• приготовление ПААГ и иммобилизация клеток *A. globiformis* в

ПААГ;

• определение влияния условий иммобилизации на эффективность процесса биотрансформации.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

• колбы объемом 100 мл;

• пипетки стеклянные объемом от 2 до 50 мл;

• смесь бензол/ацетон (3:1);

• хлороформ;

• пластины «Силуфол» (УФ-254);

гранулы ПААГ с иммобилизованными клетками *A. Globiformis;*

• раствор ? 1, содержащий 1,9 г акриламида, 0,1 г метиленбисакриламида, H_2O до 11 мл;

• раствор ? 2, содержащий 6 мл суспензии клеток *A. globiformis* в 10 мМ фосфатном буфере (17-100 мг белка сухих клеток в 1 мл раствора);

• раствор ? 3, содержащий 15 мг персульфата аммония, 3 мл H_2O;

• раствор ? 4 - 0,1 мл N, N, N, N-тетраметилэтилендиамина;

• раствор 10 мМ фосфатного буфера с pH=7,2. *Приборы:*

• термостат;

• качалка;

• газожидкостной анализатор для ВЭЖХ;

• весы аналитические;

• спектрофотометр.

Суть работы

Оценка преимуществ использования иммобилизованных клеток в процессе биотрансформации стероидных соединений.

Порядок выполнения работы Часть 1. Иммобилизация микробных клеток в полиакриламидном геле

Полиакриламид, широко используемый для иммобилизации клеток микроорганизмов, является продуктом сополимеризации акриламида со связывающим агентом - метиленбисакриламидом. В качестве инициатора полимеризации используют персульфат аммония, в качестве катализатора - N, N, N, N-тетраметилэтилендиамин.

Растворы ? 1, 2, 3, 4 смешивают в тонкостенном стакане. Полимеризацию проводят на льду или при комнатной температуре. Блоки геля с клетками механически измельчают с помощью сита (диаметр отверстий - 0,8-1,0 мм). Суспензию гранул декантируют повторно 4-5 л 10 мМ фосфатного буфера (pH=7,2), чтобы отделить

гранулы равной величины, а также удалить не включившиеся клетки и реагенты.

Все процедуры, включая приготовление бактериальной суспензии, иммобилизацию, приготовление гранул и трансформацию, необходимо проводить в строго асептических условиях.

Часть 2. Изучение влияния условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток

Условия иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ влияют на жизнеспособность микроорганизмов, которая может быть определена по каталитической активности 3-оксостероид-1, 2-дегидрогеназы. По 5 мл гранул ПААГ, полученных иммобилизацией *A. globiformis* на льду или при комнатной температуре, помещают в колбы на 100 мл, прибавляют по 50 мл 10 мМ фосфатного буфера (pH=7,2) и гидрокортизон в микрокристаллическом состоянии (частицы величиной 10-50 мкм) в концентрации 20 мг/мл. Колбы помещают на качалки при температуре 29 °С. Через 5, 10 и 20 мин биотрансформации из реакционной среды отбирают пробы по 2 мл и определяют в них концентрацию преднизолона. Для этого к анализируемым пробам добавляют двойной объем хлороформа. После интенсивного встряхивания хлороформную фазу отбирают. Процедуру повторяют трижды. Растворенный в хлороформе материал объединяют и высушивают под вакуумом. Сухой остаток растворяют в смеси бензол/ацетон (3:1). 10 мкл раствора наносят на пластины «Силуфол» (УФ-254) и проводят ТСХ в той же системе. После разделения стероидных соединений пластины подсушивают на воздухе и отмечают пятна, флуоресцирующие при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм. Материал, относительная подвижность (Rf) которого соответствует таковой преднизолона, элюируют в течение 15 мин при встряхивании.

Оптическую плотность элюата измеряют при длине волны 240 нм. Концентрацию преднизолона (С) в анализируемом растворе определяют по формуле:

$$C = \frac{A_{240} \times а \times б}{299 \times в \times 0{,}04},$$

где A_{240} - оптическая плотность полученного раствора; 299 - оптическая плотность при 240 нм 1% раствора преднизолона, длина кюветы 1 см;

а - объем ацетон-бензольной смеси (мл), в которой растворен сухой остаток;

б - объем этанола (мл), используемый для элюции преднизолона после ТСХ;

в - объем пробы, взятой для анализа, мл;

0,01 - объем пробы, нанесенной на пластины для ТСХ.

Проводят сравнение ферментативной активности гелей, полученных иммобилизацией *A. globiformis* при комнатной температуре и на льду.

Контрольные вопросы

• Чем обусловлены экономические преимущества биотехнологического производства, основанного на иммобилизованных ферментах, перед традиционным?

• Каких целей достигают при иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве?

• Как можно добиться выделения целевого белкового продукта, локализованного внутри иммобилизованной клетки, не нарушая системы?

• Как можно определить жизнеспособность микроорганизмов при иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ?

• В чем состоит основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией?

• Какие ограничения иммобилизации индивидуальных ферментов вы знаете?

ГЛАВА 8 РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ

Тема «Рекомбинантные белки» посвящена методологии генной инженерии по созданию штаммов-продуцентов видоспецифических белков человека, которые в дальнейшем применяют в качестве лекарственных препаратов. Рассмотрен мини-препаративный метод разрушения клеток *E. coli,* содержащих внедренную плазмидную ДНК, последующее ее отделение от содержимого клеточного аппарата и идентифицирующий электрофоретический анализ полученной плазмидной ДНК в агарозном геле.

Цель изучения темы: предлагаемые к практическим занятиям материалы по биотехнологии позволяют студентам ознакомиться с некоторыми аспектами деятельности генных инженеров, занятых как в области фундаментальных исследований биотехнологии, так и в производственной практике.

Данная тема представлена одним семинарским занятием, которое включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическому занятию, описание проведения лабораторной работы.

На занятии выполняется лабораторная работа: «Выделение и анализ плазмидной ДНК», состоящая из двух частей:

• разрушение клетки, отделение плазмидного вектора (ДНК);

• анализ штамма JM-109 *E. coli* на присутствие вектора, продуцирующего видоспецифический белок человека - инсулин.

Занятие проводится на базе Учебно-научного центра Института биоорганической химии (ИБХ) РАН им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Проблематика данного занятия тесно связана с деятельностью производственного отдела ИБХ, являющегося небольшим заводом, приоритетное направление деятельности которого - производство инсулина. Препарат на продажу, производство которого осуществляют в ИБХ РАН, носит название инсуран*.

Занятие построено по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выпол-

нение работы студентами и письменное ее оформление, защита полученных результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 14. АНАЛИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *E. COLI* НА ПРИСУТСТВИЕ ВЕКТОРА, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ИНСУЛИН

Введение

Еще тысячи лет назад люди научились избирательно комбинировать генетический материал растений и домашних животных одного вида (очень редко близкородственных видов). С этой целью производили отбор особей, обладающих полезными качествами и пригодных для выведения потомства. С помощью скрещивания таких наиболее ценных особей и отбора (селекции) для дальнейшего размножения лучших из их потомков человек изменил первоначальный набор генетического материала одомашненных животных и растений. В настоящее время к методу селективного скрещивания добавили метод комбинирования генов на молекулярном уровне с помощью точнейших методов генной инженерии. Однако между этими эволюционными направлениями существует принципиальное различие: при селективном скрещивании происходит перенос больших наборов неизвестных генов между родственными организмами. В отличие от этого генная

инженерия позволяет перемещать единичные гены, обладающие известными функциями, из одного организма в любой другой, например от животных к растениям или от микроорганизмов к животным.

Чем более точными становятся проделываемые генно-инженерные операции и более предсказуемыми получаемые результаты, тем сильнее снижается риск возникновения организмов с неожиданными и нежелательными характеристиками. Кроме того, при этом отпадает необходимость в трудоемком и длительном методе проб и ошибок, используемом в традиционной селекции. Постепенное увеличение спектра живых организмов - источников полезных генов со временем позволит человеку использовать весь потенциал природного многообразия.

Методики повышения предсказуемости и точности селективного скрещивания с течением времени постоянно совершенствуются. Так, в 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик, исходя из результатов экспериментов и построения моделей, создали двухцепочечную модель

ДНК. В 1972 г. Пол Берг с коллегами с помощью рестрикционных ферментов создали первую рекомбинантную молекулу ДНК, а уже через 10 лет первый рекомбинантный лекарственный препарат, синтезированный с помощью рекомбинантной ДНК (человеческий инсулин), появился на фармацевтическом рынке.

Биотехнология, сформировавшаяся на стыке многих направлений как фундаментальной, так и прикладной науки, в значительной степени обогащена приемами генной инженерии. Например, с помощью генной инженерии удалось преодолеть существующие в природе при передаче генетической информации межвидовые барьеры и получить возможность создания совершенно новых генетических комбинаций.

Теоретические аспекты получения видоспецифических белков человека с помощью рекомбинантных штаммов

Методология генной инженерии позволяет встраивать *in vitro* в геном векторных (информативных) молекул ДНК, в частности плазмид, вирусов и т.д., отдельные участки-гены и далее вводить в определенных условиях полученные гибридные молекулы в пермессивные клетки (как прокариотические, так и эукариотические), амплифицировать и экспрессировать в них клонированные чужеродные гены, ответственные за синтез различных лекарственных веществ. Именно с помощью таких методов были получены штаммы бактерий, дрожжей, линии культур клеток животных, с высокой эффективностью продуцирующие биологически активные белки человека и животных. Работы по созданию штаммов-продуцентов имеют очень большое значение для медицины и ветеринарии и одновременно являются стимуляторами бурного развития тех отраслей промышленности, которые активно используют биотехнологические методы производства.

Биотехнологическое производство видоспецифических белков человека в качестве лекарственных препаратов (инсулина, гормона роста, интерферонов и т.д.) позволяет производить эти продукты в необходимых для нужд страны количествах (огромных по

сравнению с недавним прошлым), а также значительно упрощает процедуру их очистки вплоть до получения в нативном состоянии. Кроме того, применение методов генной инженерии при биотехнологическом производстве этих лекарственных препаратов дает значительные экономические преимущества по сравнению с традиционными технологиями, использующими утилизацию природного сырья.

Значительную часть от общего объема ЛС, полученных с помощью генно-инженерных методов, составляют рекомбинантные белки, биосинтез которых осуществляют при участии различных штаммов кишечной палочки *(Escherichia coli),* один из которых используют при производстве инсулина. Для *E. coli*разработан целый спектр молекулярных векторов различного назначения, в частности плазмид. Нередко этот микроорганизм применяют в качестве «промежуточной» системы клонирования при конструировании гибридных молекул ДНК для других типов клеток. Сама разработка методологии генной инженерии на клетках грамотрицательной бактерии *E. coli* как никогда приблизила молекулярную биологию к биотехнологии, в результате чего последняя получила мощный импульс для развития.

В условиях промышленного производства после анализа клеток соответствующего штамма *E. coli* (в определенной стадии их жизнедеятельности) на присутствие в них вектора (плазмидной ДНК), который в определенных условиях продуцирует инсулин, к клеточной суспензии добавляют индуктор - вещество, которое запускает внутриклеточный механизм активации гена, кодирующего информацию об инсулине.

Полученный биотехнологическими методами инсулин от прилавка аптеки отделяет еще достаточно

Полученный биотехнологическими методами инсулин от прилавка аптеки отделяет еще достаточно серьезный путь тщательной очистки препарата от возможных примесей с использованием самых современных технологий.

Люди, страдающие сахарным диабетом, ежедневно используют биосинтетический (рекомбинантный) человеческий инсулин, как уже было сказано выше, первый биотехнологический препарат, появившийся на фармацевтическом рынке. До этого у больных, страдающих аллергией на инсулин животного происхождения, альтернативных вариантов не было. В ближайшем будущем планируют выпуск ингаляционной и других лекарственных форм рекомбинантного инсулина.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия:

• научиться оперировать понятиями «методология генной инженерии» и «видоспецифические белки человека, используемые в качестве лекарственных препаратов»;

• научиться применять метод выделения плазмидной ДНК;

• получить представление об электрофоретическом методе анализа рекомбинантных штаммов на присутствие вектора, продуцирующего видоспецифический белок.

К занятию необходимо знать:

• основную схему работы генного инженера при получении рекомбинантных структур;

• меры предосторожности в условиях работы с рекомбинантами;

• методы стерилизации материалов и оборудования. К занятию необходимо уметь:

• правильно работать с микропипетками;

• обращаться с настольной центрифугой;

• поддерживать стерильность материалов и оборудования;

• окрашивать соответствующим красителем раствор плазмидной ДНК;

• визуально оценивать в УФ-свете присутствие минимальных количеств ДНК в геле.

Контрольные вопросы

• Что означает понятие «методология генной инженерии»?

Какие видоспецифические белки человека получают с помощью биотехнологии?

• Какие способы получения генно-инженерного инсулина используют в настоящее время? В чем их отличие?

• Почему в качестве микроорганизма-хозяина при получении генно-инженерного инсулина применяют клетки *E. coli?*

• Как методически осуществляют выделение и анализ плазмидной

ДНК?

• В чем заключается суть метода электрофоретического анализа белковых структур?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Генетическая инженерия».

2. Настоящее учебно-методическое пособие.

3. *Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н.* Биотехнология: учебное пособие для студентов фармацевтических факультетов. - М.: Академия, 2006.

Дополнительная

1. Практикум по биоорганической химии. Раздел «Химия нуклеиновых кислот и основы генетической инженерии» / под ред.

Т.В. Овчинниковой, Т.И. Сорокиной. - М.: ИБХ РАН, 2007.

2. *Мониатие Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 2000.

Лабораторная работа ? 17 Выделение и анализ плазмидной ДНК

Цель работы: научиться выделять из трансформированных клеток *E. coli* векторную плазмидную ДНК мини-препаративным методом, проводить анализ плазмидной ДНК с помощью электрофореза.

Целевые задачи

- разрушить (лизировать) клетки культуры *E. coli;*
- получить векторную ДНК в виде осадка;
- качественно и количественно (визуально) оценить плазмидную ДНК под УФ.

Материальное обеспечение работы

Материалы:

- образцы трансформированных клеток *E. coli* штамма JM-109 (раствор ДНК);
- пробирки объемом 1,5 мл;
- наконечники для микропипеток;
- регулируемые микропипетки;
- эксикатор;
- раствор GTE (глюкоза/трис-буфер/EDTA);
- 0,8% агароза;
- бромистый этидий (EtBr);
- трис-буфер, содержащий EDTA (TE);
- 1% раствор детергента SDS;
- буферная система (3 M CH_3COONa с pH=4,8);
- изопропиловый спирт, 80% этиловый спирт. *Приборы:*
- установка для проведения электрофореза - источник тока, камера, пластины для геля, гребенки;
- УФ-лампа;

• настольная центрифуга (15 000 об/мин);

• центрифужные весы.

Суть работы

Выделение с помощью мини-препаративного метода плазмидной ДНК из трансформированных клеток *E. coli* и ее идентификация методом гель-электрофореза.

Подготовительный этап

Работа е микропипетками

В протоколах большинства лабораторных работ фигурируют очень малые объемы растворов ДНК и реагентов. Для «взятия» таких малых объемов, как один микролитр (мкл), используют регулируемые микропипетки. При проведении генно-инженерных работ в лабораторных условиях, как правило, применяют микропипетки и наконечники нескольких типов следующих объемов:

• от 100 до 1000 мкл;

• от 50 до 200 мкл;

• от 10 до 100 мкл;

• от 1 до 20 мкл.

Учитывая вышесказанное, для проведения генно-инженерных манипуляций в лабораторных условиях и получения стабильных результатов в последующих экспериментах необходимо научиться правильно работать с микропипетками.

При заборе раствора из реакционной пробирки:

• нажать на кнопку пипетки до первого сопротивления (упора) и задержать в этой позиции, затем опустить наконечник в жидкость, используемую для забора и, постепенно отпуская кнопку, набрать жидкость в наконечник;

• вынуть пипетку, касаясь наконечником внутренней стенки реакционной пробирки для снятия капель жидкости снаружи наконечника.

Проверить: полностью ли заполнен кончик пипетки.

Внимание! Очень легко взять большее/меньшее количество раствора, что в результате нескольких добавлений может привести к искажению результатов.

При выдавливании раствора в реакционную пробирку:

• коснуться наконечником внутренней стенки реакционной пробирки, в результате этого действия возникает капиллярный эффект, который помогает жидкости вытекать из кончика;

• выдавить образец, медленно нажимая на кнопку до первого упора, затем, чтобы удалить остатки жидкости, нажать на кнопку до второго упора и удерживать ее в этом положении;

• вынуть пипетку из реакционной пробирки, удерживая при этом кнопку на втором упоре, чтобы препятствовать всасыванию жидкости назад в наконечник.

Проверить:

• не осталось ли небольшое количество жидкости в пробирке;

• не находятся ли жидкость из пробирки и небольшой пузырек воздуха в наконечнике пипетки.

• Для удаления наконечника нажать соответствующую кнопку до упора. Сброс использованных наконечников производят в специальный стакан на лабораторном столе.

• Для предотвращения возможного загрязнения используемых реагентов необходимо:

• добавлять соответствующие количества одного из реагентов последовательно во все реакционные пробирки;

• выдавливать каждую порцию следующего реагента на новые места внутренней стенки реакционной пробирки;

• использовать новый наконечник для каждого нового реагента.

Порядок выполнения работы Часть 1. Разрушение клетки и отделение плазмидного вектора (ДНК)

Прежде чем начинать эксперимент, следует отметить, что питательные среды для выращивания бактериальных культур одновременно являются идеальными для роста посторонних микроорганизмов. Именно поэтому, для того чтобы уменьшить вероятность случайного заражения целевой культуры чужеродными бактериями и грибами, очень важно поддерживать стерильные условия. Все, что контактирует с бактериальной культурой: питательные среды, растворы, пипетки, наконечники для микропипеток, петли и шпатели для переноса и высева клеток, колбы и пробирки с клеточной культурой, чашки, должно быть стерильно. Однако в эксперименте по разрушению клеточных структур и последующему отделению нужного объекта стерильность не учитывается. Здесь достаточно соблюдать обычные правила выполнения лабораторных экспериментов:

работать в халатах;

• пользоваться тщательно вымытыми, ополоснутыми дистиллированной водой и высушенными наконечниками для пипеток, шпателями, стаканами, колбочками и другой посудой.

Внимание! Опасность для экспериментатора представляют его собственные руки, на поверхности которых находятся агрессивные ферменты - нуклеазы неспецифического

действия. Присутствие нуклеаз и возможность их попадания в экспериментальные пробирки могут привести к нарушению целостности выделенной ДНК и в резуль-

тате свести на нет всю проделанную работу. Чтобы избежать этого, необходимо работать в перчатках и открывать опытные пробирки, не касаясь внутренней поверхности крышки пробирки.

• В две пробирки объемом 1,5 мл добавить 1,5 мл культуры *E. coli.*

• Центрифугировать в течение 1 мин для осаждения клеток (пробирки в роторе центрифуги должны быть тщательно уравновешены на весах и расположены симметрично).

Для отделения мелкодисперсных осадков используют центрифугирование, в ходе которого под действием центробежной силы твердая фракция в предварительно уравновешенных пробирках осаждается и уплотняется на дне центрифужных пробирок, а находящуюся над осадком жидкость либо сливают, либо переносят в другую пробирку (в зависимости от особенностей и характера эксперимента). Для центрифугирования применяют настольные центрифуги, развивающие скорость до 15 000 об/мин, и микропробирки (1,5 мл), выполненные из соответствующего пластика.

• Слить раствор над осадком (при сливе раствора необходимо проявлять осторожность, чтобы не разрушить осадок, состоящий из клеток). Перевернуть пробирки на фильтровальную бумагу и осторожно постучать для удаления остатков жидкости.

• Добавить в каждую пробирку по 100 мкл охлажденного во льду раствора глюкоза/трис-буфер/EDTA (GTE). Ресуспендировать осадок, набирая и выдавливая раствор из пипетки. Очень важно получить гомогенную суспензию (отсутствие несуспендированных клеток).

Оставить суспензию на 5 мин при комнатной температуре.

• Добавить по 200 мкл раствора SDS/NaOH (при комнатной температуре). Закрыть крышки и плавно перемешать содержимое: 1% раствор детергента SDS; буферная система глюкоза/трис-буфер/

EDTA.

• Оставить пробирки во льду(+4 °С) на 5 мин.

• Добавить небольшое количество 3 М CH_3COONa (pH=4,8), встряхнуть и снова поместить в лед на 5 мин.

• Уравновесить пробирки и центрифугировать в течение 5 мин.

• Надосадочную жидкость осторожно перенести в чистую пробирку, добавить в нее равный объем изопропилового спирта, уравновесить и сразу же отцентрифугировать в течение 5 мин.

• Слить супернатант, быстро перевернуть пробирки на фильтровальную бумагу и осторожно постучать для удаления остатков раствора. Проявлять осторожность, чтобы при сливе супернатанта не потерять осадок нуклеиновой кислоты (вектора).

На этой стадии уже можно наблюдать ДНК (векторную, плазмидную) в виде осадка, образование которого свидетельствует о том, что в клетках *E. coli* действительно присутствует векторная ДНК (во второй части работы при знакомстве с электрофоретическим методом можно будет увидеть эту ДНК под УФ), которая может продуцировать целевой инсулин. Для этого к оставшейся части клеток необходимо добавить индуктор и запустить процесс наработки нужного рекомбинантного белка внутри клеток *E. coli* штамма JM-109.

• Промыть осадок 80% этиловым спиртом.

• Высушить осадок от спирта в эксикаторе под вакуумом.

• Добавить в пробирки по 15-30 мкл трис-буфера, содержащего EDTA (ТЕ). Ресуспендировать осадок, перемешивая его, набирая и выдавливая раствор. Проверить (визуально) полноту растворения ДНК (отсутствие нитей ДНК на наконечнике и на стенках пробирки).

На данной стадии раствор (ДНК/ТЕ) может храниться при температуре -20 °С до продолжения эксперимента. Перед использованием раствор ДНК необходимо разморозить.

Часть 2. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК в агарозе

Для электрофоретического анализа раствора плазмидной ДНК следует использовать либо агарозный, либо ПААГ. Однако акриламид токсичен и быстро проникает в организм человека через кожу, поэтому чаще работают с агарозой.

• Навеску сухой агарозы залить необходимым объемом раствора электролита, подогреть до полного растворения агарозы.

• Осторожно налить раствор охлажденной до 50 °С агарозы в кассету (пластину) на глубину около 4 мм (агароза должна быть достаточно охлаждена, чтобы можно было держать колбу в руках). Гель должен покрывать около 13 мм высоты зубьев гребенки, помещенной в кассету.

• Не двигать кассету до тех пор, пока агароза не затвердеет. Как только это произойдет (10-15 мин), она перестанет быть прозрачной.

• После затвердевания снять клейкую ленту. Поместить кассету (пластину) в электрофоретическую камеру таким образом, чтобы гребенка располагалась ближе к катоду (отрицательный электрод).

• Заполнить камеру Ix-TBE буфером до уровня, покрывающего гель (TBE-буфер используют многократно, поэтому после однократного применения выливать его не следует).

• Осторожно, не повредив гель, удалить гребенку (буферный раствор облегчает выполнение этой операции).

• Ячейки в геле после удаления гребенки должны быть заполнены буфером (после завершения данной стадии можно закрыть электрофоретическую камеру и сохранять образцы до продолжения эксперимента).

Стандартная методика достаточно проста и занимает около 1,5 ч. Результаты эксперимента легко поддаются визуальной оценке вследствие того, что существует возможность следить непосредственно за движением ДНК в агарозном геле, так как прямо в ходе эксперимента полосы ДНК могут быть окрашены флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем - бромистым этидием (EtBr) в низкой концентрации. Анализ такого геля в УФ-свете позволяет отслеживать присутствие даже минимальных количеств ДНК (в нанограммах).

Электрофорез

• Добавить по 1 мкл красителя к 5-10 мкл раствора плазмидной

ДНК.

• Закрыть крышки пробирок и центрифугировать 1-2 с (соблюдать симметричное положение пробирок в роторе) для смешивания красителя с раствором.

• Нанести микропипеткой содержимое каждой пробирки в отдельные ячейки геля (лист черной бумаги под электрофоретической камерой позволит более четко видеть ячейки). При этом необходимо: твердо зафиксировать двумя руками пипетку над ячейкой (проявлять осторожность, чтобы не повредить ячейку кончиком пипетки); аккуратно выдавить образец в ячейку (если кончик пипетки расположен над центром ячейки, то раствор будет опускаться на ее дно).

• Закрыть крышку электрофоретической установки и присоединить анод к аноду (красный-красный), катод к катоду (черный- черный). Проверить, чтобы оба электрода были присоединены к одному источнику тока.

• Установить напряжение 100 В и запустить электрофорез. Вскоре после начала электрофореза произойдет движение красителя через гель к положительному полюсу - аноду (оранжевая цветная полоса).

• Проводить электрофорез в течение 20-40 мин (хорошее разделение происходит после прохождения первым красителем 4-8 см от старта).

Можно установить напряжение 25-50 В и осуществлять электрофорез несколько часов (при более длительном сроке красители и ДНК могут выйти из геля в буфер).

• Выключить источник тока и отсоединить камеру.

• Осторожно извлечь гель из камеры и поместить в ванночку. Можно завернуть гель в тонкую пленку и хранить в течение 12 ч при 5 °С. Однако при этом ДНК диффундирует в геле, и полосы становятся размытыми.

Внимание! Стадии, связанные с окраской и фотографированием геля, будут выполнены преподавателем.*Окраска этидий бромидом*

При окрашивании и фотографировании геля должны быть использованы резиновые перчатки.

• Надеть резиновые перчатки и залить гель раствором этидий бромида (1 мкг/мл).

• Оставить окрашиваться на 5-10 мин (время окрашивания зависит от толщины геля). Осторожно покачивать окрашиваемый гель для более быстрой диффузии этидий бромида.

• Слить раствор этидий бромида (можно применять его многократно). При сливе использовать воронку.

• Промыть гель для удаления избытка этидий бромида (хлорированная вода инактивирует следы этидий бромида).

Фотографирование геля

Внимание! УФ-свет оказывает вредное воздействие на зрение. Никогда не смотрите на УФ-источник незащищенными глазами. Используйте фильтр или безопасные очки, не пропускающие вредные для зрения лучи.

• В поляроидной камере установить диафрагму 5,6 и выдержку 1 с. Время экспозиции значительно меняется в зависимости от уровня окрашивания, его подбирают экспериментальным путем.

• Нажать кнопку «Старт» поляроидной камеры.

Контрольные вопросы

• Какие условия выбора конкретного продуцента инсулина вы знаете?

• С чем может быть связано проявление побочного действия при применении различных видов инсулина?

• Почему при работе с рекомбинантными структурами следует соблюдать особые меры безопасности?

• Почему при биотехнологическом получении инсулина необходимо использовать лидерную последовательность аминокислот с метионином и β-галактозидазой?

• Какова роль лактозы (галактозы) в процессе ферментации и получении завершенных инсулиновых цепей?

• Почему метод гель-электрофореза удобен для идентификации нуклеиновых кислот?

• Почему внедрение методов генной инженерии в фармацевтическое производство открывает неограниченные перспективы для создания новых поколений лекарств XXI века?

ГЛАВА 9 ВАКЦИНЫ

Тема «Вакцины» посвящена изучению основ технологии производства вакцин, что является неотъемлемой частью иммунобиотехнологии. Приведены краткое изложение теоретических основ получения вакцин и определение биологической активности вакцинного вируса. Схематически представлены основные этапы технологического процесса получения коревой вакцины в условиях асептического производства. Особое внимание уделено расчетам активности готового продукта, что необходимо для контроля качества биологической активности согласно ФС.

Цель изучения темы: на основе знания основ технологии получения вакцин научиться оценивать биологическую активность вакцинного вируса кори в соответствии с нормативно-технической документацией.

Данная тема представлена одним семинарским занятием, которое включает краткую теоретическую часть, задание для самоподготовки к практическому занятию, описание проведения лабораторной работы, приложение с разбором решения задачи по вышеуказанной теме, список рекомендованной литературы.

На занятии выполняется лабораторная работа «Определение титра посевного вируса противокоревой вакцины».

Промышленное производство противокоревой вакцины осуществляют на московском предприятии бактерийных препаратов НПО ФГУП «Микроген».

Занятие строится по следующему плану: вводная беседа преподавателя, проверка подготовленности к занятию с использованием вопросов для самопроверки, методические указания преподавателя перед выполнением лабораторной работы, индивидуальное выполнение работы студентами и защита ее результатов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ ? 15. КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВОКОРЕВОЙ ВАКЦИНЫ

Введение

Корью болеют только люди, т.е. корь - это антропоноз. Возбудитель кори был открыт еще в 1911 г., однако основные исследования вируса кори были проведены только в 1954 г. Корь - заразное заболевание, передающееся при чихании и кашле. В тяжелых случаях возникают осложнения: воспаление среднего уха, мозга (энцефалит) и легких, которые могут приводить к глухоте, судорогам и гибели больного. Заболевший корью человек служит источником инфекции начиная с 2-4-го дня до появления сыпи и в последующем в

течение острого периода заболевания. Инкубационный период длится в среднем около 2 нед. Во многих странах мира корь занимает ведущее место в общей инфекционной патологии. Ежегодно в мире от всех инфекций умирает 1,6 млн детей, причем корь занимает среди причин смерти первое место: ею заболевают около 45 млн человек, из которых в среднем около 1 млн умирает. Сильнейшая за последние годы вспышка кори была зарегистрирована в Японии, где жертвами этого опасного заболевания стали не только дети, но и взрослые, прежде всего студенты столичных университетов. В связи с крайне быстрым распространением инфекции власти страны даже были вынуждены на некоторое время закрыть эти учебные заведения. В настоящее время в высокоразвитых странах корь не представляет собой масштабной проблемы, поскольку большинство детей проходят вакцинацию в возрасте до 2 лет. Однако в менее развитых странах множество детей умирает от таких осложнений кори, как энцефалит, пневмония и диарея. Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Всемирного детского фонда (ЮНИСЕФ) разработали стратегический план по борьбе с корью, благодаря которому в 2005 г. смертность от этой инфекции сократилась вдвое. Тем не менее из-за высокой вирулентности возбудителя заболевания охват вакцинацией должен быть полным практически во всем мире, чего не удается достичь вследствие трудностей с доставкой вакцины отдельным малодоступным группам детей с высоким риском заражения. По данным ВОЗ, хуже всего ситуация с вакцинацией обстоит в странах Африки. В то же время и в некоторых развитых странах, например

Великобритании, некоторые родители отказываются делать детям прививки против кори, свинки и краснухи, мотивируя это сведениями о связи вакцинации с развитием аутизма. В России ликвидация кори идет успешно, интенсивный показатель заболеваемости корью по сравнению с 2003 г. снизился на 25%. Полную же ликвидацию кори на территории России планируют к 2010 г.

Классификация вакцин

Существует несколько классификаций вакцин. Наиболее распространенный тип классификации, а также область применения вакцин представлены на рис. 9 и в табл. 9.



Рис. 9. Классификация современных типов вакцин

Таблица 9. Вакцины, используемые в медицинской практике в Российской Федерации

Вид вакцины	Область применения
Живые	Бруцеллез, грипп, корь, Ку-лихорадка, желтая лихорадка, эпидемический паротит, полиомиелит, сибирская язва, туберкулез, сыпной тиф, туляремия, чума
Инактивированные и субъединичные	Бешенство, брюшной тиф, грипп, клещевой энцефалит, коклюш, холера, лептоспироз, гепатит А, сыпной тиф, герпес
Химические	Менингококковая инфекция, холера, брюшной тиф
Анатоксины	Дифтерия, столбняк, газовая гангрена, ботулизм, холера, стафилококковые и синегнойные инфекции
Рекомбинантные	Гепатит В
С искусственным адъювантом	Гриппозная вакцина с полиоксидонием*

Живые вакцины

Наибольшее распространение получили живые вакцины, которые разрабатывают против возбудителей, имеющих устойчивую антигенную структуру. Основой вакцины является получение вакцинного штамма. Вакцинный штамм - это аттенуированный, т.е. ослабленный, дикий (эпидемиологический) вирус. Живые вакцины из аттенуированных микроорганизмов представляют собой культуры наследственно измененных форм патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), утративших свою патогенность, но сохранивших иммуногенную активность.

Инактивированные вакцины

Инактивированными их называют потому, что возбудители подвергаются такой обработке, которая приводит к необратимой утрате способности к воспроизведению (репродукции, размножению), но при этом сохраняются антигенные и иммуногенные свойства.

Технология получения противокоревой вакцины

Приготовление вакцинного штамма

На предприятие по производству вакцин поставляют оплодотворенные яйца японских перепелов, где их сначала помещают в параформалиновые камеры, в которых отделяют случайно попавшие

неоплодотворенные яйца от оплодотворенных. Затем оплодотворенные яйца инкубируют до 11-дневного возраста. Именно в этом возрасте эмбрионы из оплодотворенных яиц могут быть использованы в качестве субстрата для культуризации.

В асептических условиях измельченные ткани эмбриона обрабатывают трипсином для получения клеточной суспензии, которую фильтруют, определяют количество клеток в единице объема культуральной жидкости и при необходимости доводят до нужной концентрации (в процессе пересева после трипсинизации можно оценить состояние клеточной культуры, т.е. подсчитать общее количество клеток, а также выявить в их числе мертвые и живые клетки. Для этих целей используют метод подсчета клеток в гемоцитометре - камере Горяева).

Заражение вакцинного штамма посевным вирусом

Посевной вирус сначала титруют и определяют $ТЦД_{50}$ (количество вируса, которое при заражении культуры клеток в 50% случаев дает цитопатический эффект). Далее вакцинный штамм заражают посевным вирусом. Доза заражения составляет 0,02-0,03 $ТЦД_{50}$ в 1 мл.

После этого зараженные клетки помещают в роллеры (специальные бутыли конической формы для культивирования таких клеток), так как вирус растет и размножается только в растущих клетках. В процессе культивирования (роллер медленно вращается вдоль горизонтальной оси) клетки прикрепляются к внутренней поверхности роллера и образуют целостный монослой. Большое значение имеет скорость вращения роллера. Она не должна быть слишком большой, чтобы не препятствовать прикреплению клеток, но и не может быть слишком низкой, так как длительное нахождение клеток в газовой фазе ухудшает условия их питания. В течение первых 30 мин после засева обеспечивают низкую скорость вращения (0,5-1 об/мин) для равномерного распределения материалов, а затем скорость вращения увеличивают до 2-3 об/мин. Результатом взаимодействия клеток вакцинного штамма и посевного вируса будет цитопатический эффект (дегенерация инфицированных клеток). Через 3-4 дня делают первый слив. Затем в роллер добавляют только поддерживающую среду и через 1-2 дня делают второй слив. Таким путем можно

получить 3-4 слива, т.е. 200-300 мл вируссодержащей жидкости или 30 000 доз готовой вакцины (одна доза вакцины содержит 0,01 мл жидкости).

Контроль специфической активности вируса кори

Биологическую активность вакцинного вируса кори определяют по цитопатическому действию этого вируса на чувствительные культуры клеток. Процесс определения биологической активности вирусов получил название «титрование вируса». Единицей цитопатического действия считают 50% тканевую цитопатогенную дозу, поэтому под титром вируса понимают количество единиц действия вируса в единице объема вируссодержащего материала.

Титрование проводят в 96-луночных планшетах. Сначала многоканальной автоматической пипеткой переменного объема отбирают 100 мкл клеточной взвеси и вносят в лунки планшета. Затем помещают планшеты в CO_2-инкубатор с температурой инкубации 36±1 °С и атмосферой, состоящей из 5-10% углекислого газа, на 24-48 ч. По истечении данного времени по инвертированному микроскопу исследуют морфологию клеток в культуре, которая в норме должна соответствовать популяции исходной линии и состоять из эпителиоподобных клеток без признаков зернистости и дегенерации. Каждую лунку планшета просматривают на наличие цитопатического действия начиная с отраслевого стандартного образца и отмечают в протоколе контроля специфической активности значком «+» те лунки, в которых присутствуют признаки цитопатического действия (рис. 10).

Далее проводят расчет результатов, полученных в титровании, методом Рида-Менча или Кербера, принимая во внимание то обстоятельство, что при титровании в лунки планшета вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины (объем в 5 раз меньше, чем прививочная доза). С учетом этого для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в $ТЦД_{50}$/0,1 мл, добавляют постоянную величину, равную lg5, т.е. 0,7.

Сохранение полученной вакцины

Итак, главная операция - получение самой вакцины. Все остальные действия направлены на сохранение вакцины. Для этого готовую вакцину подвергают лиофильной сушке. Перед высушиванием проверяют титр вируса, наличие контаминантов. Затем добавляют стабилизатор, который одновременно является криопротектором (смесь высокомолекулярных компонентов - декстран, желатин, пептон - и низкомолекулярных - глютамат, а также буферных компонентов - трис-буфер). Вакцину замораживают до температуры -42-43 °С (если не использовать стабилизатор, то вирус будет разрушен). После лиофильного высушивания получают готовый продукт. Для того чтобы

Разведение

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-2	A	+	+	+	+	+	+						
-3	B	+	+	+	+	+	+						
-4	C	−	+	+	+	−	−						
-5	D	+	+	+	+	+	+						
ОСО -2	E	+	+	+	+	+	+						
-3	F	−	+	−	−	−	−						
-4	G												
	H												
	Плашка №							Дата					

Рис. 10. Планшет с результатами титрования: ОСО - отраслевой стандартный образец

предотвратить попадание в ампулы кислорода воздуха, их заполняют инертным газом (азотом или аргоном). Затем производят автоматическую запайку ампул и маркировку.

Задание для самоподготовки

Цель изучения темы занятия: ознакомиться с общими принципами технологии получения живых вакцин на примере противокоревой вакцины.

К занятию необходимо знать:

• классификацию вакцин;

• области применения вакцин;

• методы оценки состояния клеточной культуры;

• метод контроля специфической активности вируса кори. К занятию необходимо уметь:

• проводить исследование культуры при помощи инвертированного микроскопа «Биолам»;

• проводить расчет результатов, полученных в титровании, методом Рида-Менча или Кербера.

Контрольные вопросы

• Приведите классификацию и области применения вакцин.

• В чем заключается отличие вирусов от бактерий?

• Для чего в процессе получения вакцины необходимо определять титр вируса?

• Назовите характерные признаки цитопатического действия вируса.

• Для чего в готовый продукт добавляют стабилизатор?

Литература

Обязательная

1. Лекции по теме «Иммунобиотехнология».

2. Настоящее учебно-методическое пособие. Дополнительная

1. *Медуницин Н.В.* Вакцинология. - М.: Триада-Х, 1999.

2. *Дьяконов Л.П., Ситьков В.И.* Животная клетка в культуре. Методы и применение в биотехнологии. - М.: Компания «Спутник», 2000.

Лабораторная работа ? 18 Определение титра посевного вируса кори

Цель работы: ознакомление с методологией проведения микробиологического контроля активности вакцин.

Целевые задачи

• провести изучение цитопатического действия вируса на чувствительные культуры клеток;

• научиться рассчитывать количество клеток вируса в растворе.

Материальное обеспечение работы

Материалы: планшеты пластиковые, 96-луночные, с культурой клеток *Vero,* инфицированной цитопатогенным вирусом кори. *Приборы:* микроскоп инвертированный «Биолам».

Суть работы

Качественный и количественный анализ дегенеративных изменений в культуре клеток, инфицированных вирусом кори.

Порядок выполнения работы

• На представленных в виде цветных фотографий образцах инфицированных клеток выделить характерные признаки цитопатического действия вируса кори.

• Определить титр вируса:

- по Риду-Менчу (см. приложение);

- по Керберу (см. приложение).

• Дать сравнительную оценку результатов, полученных этими методами.

Контрольные вопросы

• Дайте характеристику термина «антигенсвязывающая активность».

• Какие ограничения применения противовирусных вакцин вы знаете?

• В чем заключается отличие живых вакцин от инактивированных? Какие из них наиболее широко применяют в настоящее время и почему?

• Почему при получении противокоревой вакцины в РФ используют вакцинный штамм на основе культуры клеток эмбрионов японских перепелов?

• Какие отличительные особенности хранения вакцин вы знаете?

• Почему ликвидация кори является актуальной задачей во всех странах мира?

• Разработка и создание каких типов вакцин, на ваш взгляд, наиболее перспективна, почему?

• В чем заключается отличие расчета титра вируса по Риду-Менчу и Керберу?

Приложение

Пример расчета дозы (разведения) вируса, дающей 50% эффект ($ЭД_{50}$) *По Риду -Менчу*

Этот метод предусматривает использование кумулятивных данных, которые получают исходя из предположения, что тест-объект, выживший при заражении определенной дозой (разведением) вируса, от заражения меньшей дозой также обязательно бы выжил. И наоборот, тест-объект, павший от заражения определенным разведением вируса, обязательно пал бы от заражения меньшим разведением (большей дозой) вируса. Количество выживших и павших тестобъектов увеличивают на каждое разведение путем суммирования с предыдущими, следуя от большего к меньшему. Рассмотрим эксперимент, результаты которого приведены в табл. 10.

Для получения кумулятивных данных (кумуляция - накопление) рассуждают следующим образом. Берут колонку фактических данных с отрицательной реакцией на заражение (у нас это колонка выживших

Таблица 10. Экспериментальные данные заражения тест-объектов вирусом в различных разведениях

Разведение вируса	Фактические данные		Кумулятивные данные			
	Выжило	Пало	Выжило	Пало	Отношение павших к зараженным	Летальность, %
10^{-1}	0	6	0	20	20:20	100
10^{-2}	0	6	0	14	14:14	100
10^{-3}	1	5	1	8	8:9	88,8
10^{-4}	4	2	5	3	3:8	37,5
10^{-5}	5	1	10	1	1:11	9
10^{-6}	6	0	16	0	0:16	0
10^{-7}	6	0	22	0	0:22	0

после заражения тест-объектов) и идут от меньшего значения разведения к большему. Как видно

из таблицы, от заражения вирусом в разведении 10^{-1} ни один тест-объект не выжил, также никто не выжил и при заражении 10^{-2}. От заражения вирусом в разведении 10^{-3} выжил лишь один тест-объект, а от заражения в разведении 10^{-4} - 4 тест-объекта. К этой цифре прибавляют единицу, исходя из того, что тест-объект, выживший от заражения в дозе 10^{-3}, естественно заведомо выжил бы от дозы вируса в разведении 10^{-4}, так как доза в разведении 10^{-4} меньше, чем 10^{-3}. При разведении 10^{-5} выжило 5 тестобъектов плюс один, выживший от заражения дозой 10^{-3}, и плюс еще 4, выживших от заражения в разведении 10^{-4}, которые соответственно от заражения дозой 10^{-5}также выжили бы. Все эти тест-объекты прибавляют к 5 фактически выжившим и в результате получают цифру 10. Аналогично рассуждают и при анализе остальных разведений.

Для положительно реагирующих на заражение (их обозначают «павшие») рассуждения ведут в обратном порядке (начинают с максимального разведения - 10^{-7}) и также суммируют от меньшего к большему.

После получения кумулятивных данных рассчитывают процент положительно реагирующих на заражение (в нашем примере павших) для каждого разведения, например для разведения 10^{-4}: пало 3 и выжило 5, т.е. пало 3 из 8, что равно 3/8x100=37,5%.

Как видно из полученных результатов, 0,3 мл суспензии вируса ни в одном из взятых разведений не убивает ровно 50% тест-объектов, поэтому такое разведение вируса (или дозу вируса, $ЛД_{50}$) необходимо рассчитать.

Из табл. 10 видно, что 0,3 мл суспензии вируса в разведении 10^{-3} убивает более 50% тест-объектов (88,8%), а в разведении 10^{-4} - меньше 50% (37,5%). Значит, искомое разведение находится между 10^{-3} (1:1000) и 10^{-4}(1:10 000). Чтобы его найти, надо воспользоваться формулой:

$$\lg ЛД_{50} = \lg B - \left(\frac{b-50}{b-a}\right) \times \lg d,$$

где $ЛД_{50}$ - искомое разведение вируса; B - разведение, дающее эффект более 50%; b - процент, соответствующий разведению B; a - процент, соответствующий разведению, дающему эффект менее 50%; d - коэффициент разведения (берем 10-кратные разведения, следовательно, коэффициент равен 10). Напомним, что lg10=1. Подставим в формулу значения букв из нашего примера:

$$\lg ЛД_{50} = \lg 10^{-3} - \left(\frac{88,8-50}{88,8-37,5}\right) \times \lg 10 = -3 - \frac{38,8}{51,3} \times 1 = -3 - 0,76 = -3,76$$

Итак, разведение вируса, 0,3 мл которого способно вызвать гибель 50% зараженных тест-объектов, равно $10^{-3,76}$ или $1:10^{3,76}$. Иначе говоря, в 0,3 мл вируса, разведенного в 10 раз, содержится одна доза $ЛД_{50}$ (т.е. доза вируса, способная убить 50% тест-объектов). Тогда в

0,3 мл исходной (испытуемой) суспензии вируса таких доз содержится $10^{3,76}$ (больше во столько раз, во сколько разведен вирус, давший 50% эффект). Следовательно, титр вируса (Т) равен:

$10^{3,76}$ $ЛД_{50}$ / 0,3 мл

или

Т = 10/3 *10^{3}?^{76} $ЛД_{50}$ / мл.

Искомое разведение вируса, дающее 50% эффект (ЭД), можно найти и другим способом. В нашем примере $ЛД_{50}$ лежит между разведениями 10^{-3} и 10^{-4}. Разница между летальностью выше 50%, которую дает разведение 10^{-3}, и 50% летальности равна (88,8-50)=38,8%, а разница между высшим и низшим значениями летальности равна (88,8-37,5)=51,3%. Отношение 38,8/51,3 показывает, на какую величину отличается разведение 10^{-3} от искомого. Если это отношение умножить на логарифм коэффициента разведения (lg10=1), то получим: 38,8/51,3=0,76. Следовательно, искомое разведение $ЛД_{50}$ равно:

$10^{-3-0,76}$ = $10^{-3,76}$ = 1/$10^{3,76}$, а титр вируса равен 10/3 *$10^{3,76}$ $ЛД_{50}$ / мл, т.е. титр вируса выражен числом с дробным показателем степени. Однако при необходимости его можно легко превратить в абсолютную величину с помощью таблицы антилогарифмов (четырехзначные математические таблицы В.М. Брадиса). В нашем примере $10^{3,76}$=5754, поэтому значение титра вируса можно записать следующим образом:

Т = 10/3 * 5754 $ЛД_{50}$ / мл = 19 178 $ЛД_{50}$ в 1 мл.

При проведении расчета титра вируса по Риду-Менчу следует иметь в виду, что этот метод требует наличия положительных данных, симметричных относительно 50% (например, от 0 до 100%, от 10 до 90%, от 20 до 80% и т.д.), постоянного числа тест-объектов на каждое разведение, а также отсутствия положительного эффекта от неспецифических причин. Этот метод является приближенным, но он дает величины, которые хорошо согласуются с показателями, полученными с помощью более точных методов.

Недостатки данного метода:

- более высокая доза вируса не всегда вызывает повышение летального эффекта;
- невозможно вычислить стандартную ошибку;
- может возникнуть впечатление, что работу вели с большим числом тест-объектов, чем в действительности.

По Керберу

Данный метод проще, не требует расчета кумулятивных данных, пригоден и в случаях положительного эффекта от неспецифических причин. Однако для получения результатов

с высоким уровнем достоверности необходимо, чтобы положительные данные были известны в диапазоне от 0 до 100%.

Рассчитаем $ЛД_{50}$ для тех же результатов титрования, что и в предыдущем примере.

Таблица 11. Результаты заражения

Разведение вируса	Выжило	Пало
10^{-1}	0	6
10^{-2}	0	6
10^{-3}	1	5
10^{-4}	4	2
10^{-5}	5	1
10^{-6}	6	0
10^{-7}	6	0

Для расчета $ЛД_{50}$ воспользуемся следующей формулой:

$$\lg ЛД_{50} = \lg D + \lg d / 2 - \lg d \sum (r/n),$$

где D - наивысшее разведение вируса, дающее 100% эффект (в нашем случае это 10^{-2});

d - коэффициент разведения (1:10);

n - количество зараженных тест-объектов (лунок с культурой) на каждое разведение;

r - количество положительно реагирующих тест-объектов на каждое разведение («пало», т.е. наличие цитопатического действия в лунках с культурой);

r/n - отношение положительно реагирующих тест-объектов к общему количеству в группе 0/6; 1/6 и т.д.;

∑(r/n) - сумма отношений для всех разведений, дающих эффект от

0 до 100%.

Подставив в формулу значения букв, получаем:

$$\lg ЛД_{50} = \lg 10^{-2} + \lg 10 / 2 - \lg 10 \times (0/6 + 1/6 + 2/6 + 5/6 + 6/6) =$$
$$= -2 + 0{,}5 - (14/6) = -2 + 0{,}5 - 2{,}33 = -3{,}83.$$

Следовательно, в 0,3 мл вируса, разведенного в $10^{-3,83}$ (или в $10^{3,83}$ раза), содержится одна доза $ЛД_{50}$ вируса. Далее рассуждаем так же, как и при расчете по Риду-Менчу. Если $\lg ЛД_{50}$ = -3,83$ЛД_{50}$= $10^{3,83}$ или $1/10^{3,83}$, то в 0,3 мл вируса, разведенного $1/10^{3,83}$, содержится одна $ЛД_{50}$, а в 0,3 мл исходного вируса содержится таких доз больше в $10^{3,83}$ раза, т.е. $10^{3,83}$ $ЛД_{50}$, что означает, что титр вируса в нашей суспензии равен $10^{3,83}$ $ЛД_{50}$ / 0,3 мл или Т = (10/3) * $10^{3,83}$ $ЛД_{50}$ / мл или Т = (10/3) * 6761 $ЛД_{50}$ / мл, или Т = 22536 $ЛД_{50}$ / мл.

Небольшое расхождение в величине титра вируса, рассчитанного по двум методам, произошло из-за отсутствия абсолютной точности обоих методов.

При титровании вирусов на лабораторных животных и учете реакции на заражение не по гибели животных, графу «пало» заменяют графой «положительно реагировало». В этом случае титр будет выражаться в $ИД_{50}$(вместо $ЛД_{50}$). При титровании вирусов на куриных эмбрионах поступают так же, как и при титровании на лабораторных животных, но при этом титр будет выражаться в $ЭЛД_{50}$ или $ЭИД_{50}$. При титровании вируса на культурах клеток результаты записывают в графы «ЦПЭ» и «отсутствие ЦПЭ», а титр выражается в $ТЦД_{50}$.

РАЗДЕЛ II ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ ЗАОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Биотехнология» излагает современное состояние актуального направления научно-технического прогресса в области фармации и в медицине: получение ЛС при помощи макро- и микроорганизмов и промышленных биокатализаторов (ферментов).

Изучение данной дисциплины связано с тем, что провизору необходимо знать основы получения с помощью биотехнологии широко применяемых в настоящее время таких групп ЛС, как антибиотики, ферменты, гормоны, витамины и др. Предусматривается получение знаний, умений и практических навыков при изучении биотехнологического способа производства, способов биосинтеза, контроля, выделения и очистки ЛС, а также важно знание процессов и аппаратов, используемых для этих целей, и особенностей и преимуществ биотехнологии ЛС.

Данная программа предполагает, что студенты имеют фундаментальную подготовку по теоретическим и практическим разделам медико-биологических, химических и фармацевтических дисциплин: химии, биохимии, микробиологии с основами генетики, ботаники, фармакогнозии, технологии ЛС и др.

В процессе проведения занятий студенты не только знакомятся с теорией, но и выполняют лабораторные работы, связанные с их профессиональной деятельностью в области фармацевтической и медицинской биотехнологии. На занятиях излагаются основные биотехнологические способы производства ЛС, профилактических и диагностических препаратов.

Данная дисциплина предназначена для подготовки провизоров общего профиля.

Материал изложен с учетом современных требований качества, предъявляемых ВОЗ к биотехнологическим ЛС, в том числе про-

дуктам генной инженерии. Содержание соответствует требованиям государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования по специальности 04.05.00. - Фармация.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель: формирование системных знаний, умений и навыков по получению субстанций лекарственных препаратов, ЛС, а также профилактических и диагностических средств методами биосинтеза и биотрансформации, комбинацией методов биологической и химической трансформации.

Задачи:

• обучение студентов деятельности провизора, исходя из знаний основ молекулярной биологии и генетики продуцентов, совершенствования производства методами генной инженерии и инженерной энзимологии, знания фундаментальных основ методов контроля качества и подлинности препаратов, получаемых биотехнологическими методами;

• формирование у студентов практических умений и навыков изготовления биотехнологических лекарственных препаратов, оценки качества сырья, приготовления питательных сред, полупродуктов и целевых продуктов;

• выработка у студентов способности правильно оценивать соответствие биотехнологического производства правилам good manufacturing practice (GMP), соответствие требованиям экологической безопасности применительно к используемым на производстве биообъектам-продуцентам и целевым продуктам;

• выработка правильной ориентации при оценке качества рекомбинантных белков как лекарственных препаратов;

• выработка у студентов умений и навыков пользования иммуноферментными и радиоиммунными методами определения БАВ.

ТРЕБОВАНИЯ К УРОВНЮ ОСВОЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Студент должен знать и уметь использовать:

• современные достижения фундаментальных биологических наук и биомедицинских технологий;

• концепцию видоспецифичности лекарственных веществ;

• новые парадигмы химиотерапии и принципы комбинаторной химии;

• инновационные пути создания ЛС на основе использования данных геномики, протеомики и биоинформатики;

основные нормативные документы, относящиеся к производству, контролю качества, соблюдению экологической безопасности, хранению, международным и отечественным стандартам применительно к получаемым биотехнологическими методами ЛС, а также биообъектам - их продуцентам;

• методы определения доброкачественности микроорганизмовпродуцентов, определения концентрации жизнеспособных клеток и их ферментативной активности;

• влияние биотехнологических факторов на эффективность технологического процесса и качество конечного продукта.

Кроме того, необходимо уметь:

• поддерживать оптимальные условия для биосинтеза целевого продукта и решать ситуационные задачи при отклонениях от этих условий;

• обеспечивать условия асептического проведения технологического процесса;

• оценивать применяемые на производстве и в лаборатории методы работы с рекомбинантными штаммами;

• проводить выделение и очистку лекарственных веществ из биомассы и культуральной жидкости;

• осуществлять постадийный контроль и стандартизацию получаемых препаратов (определение антимикробной активности антибиотиков, активности ферментных препаратов, жизнеспособности микроорганизмов);

• получать готовые лекарственные формы и диагностические препараты (наборы) из лекарственных веществ микробиологического происхождения;

• осуществлять анализ биологически активных соединений методом иммуноферментного анализа (ИФА);

• проводить исследования по совершенствованию биотехнологического процесса;

• выбирать оптимальные условия хранения лечебно-диагностических препаратов и оценивать их качество в процессе длительного хранения;

• обеспечивать соблюдение правил промышленной гигиены, охраны окружающей среды, охраны труда и техники безопасности.

Студент должен иметь следующие навыки:

• практической работы с нормативной документацией, лабораторными, опытно-промышленными регламентами и др.;

• определения биологической активности антибиотиков, витаминов, гормонов, рекомбинантных белков и иммунобиопрепаратов;

• эксплуатации биореакторов и корректирования технологических параметров ферментации.

Следует иметь представление:

• об основных направлениях развития биотехнологии;

• технико-экономических особенностях биотехнологических процессов;

• ресурсах природных биоценозов как источников БАВ;

• эволюции биосферы в результате антропогенной деятельности и о путях воздействия на этот процесс.

В соответствии с учебным планом на заочном отделении фармацевтического факультета выделяют количество часов, представленное в табл. 12.

Таблица 12. Почасовой план курса биотехнологии

Всего часов	Лекции	Лабораторные занятия	Аудиторная работа	Самостоятельная работа
153	14	16	30	123

Для самоконтроля студенты могут использовать тесты и ситуационные задачи.

На кафедре для студентов заочного отделения предусмотрены текущие, предэкзаменационные, а также, по желанию студентов, индивидуальные консультации.

Контроль знаний студентов заочного отделения включает написание контрольных работ (2), сдачу итогового зачета по полученным навыкам, сдачу итогового зачета (тестовый контроль) и экзамена (ситуационные задачи).

Контрольные работы студенты присылают в деканат и получают соответствующую рецензию от преподавателя кафедры.

Зачет (тестовая форма) проводят письменно, экзамен (ситуационные задачи) по курсу биотехнологии проходит в виде устного собеседования.

УЧЕБНАЯ ПРОГРАММА

Общая биотехнология

Современная биотехнология в создании и производстве лекарственных средств

• Биотехнология как наука и сфера производства. История биотехнологии и периоды ее развития. Эмпирическая биотехнология. Научная биотехнология со времен работ Пастера. Современная биотехнология: развитие после установления структуры ДНК и материальной природы гена.

Роль биотехнологии в промышленности и сельском хозяйстве. Реализация достижений молекулярной генетики, молекулярной биологии и биоорганической химии в развитии биотехнологии.

• Биотехнология и фармация. ЛС, производящиеся биотехнологическим путем. Биотехнологическая аппаратура: ферментер, биореактор. Наукоемкость технологии

современного биотехнологического производства. Прогрессивность биотехнологии в экологическом аспекте.

• Сочетание биосинтеза и органического синтеза в производстве лекарственных веществ. Сочетание методов химической и биологической трансформации в получении и производстве современных лекарств.

Биообъекты-продуценты лечебных, профилактических и диагностических средств. Биообъекты-ферменты, используемые в качестве промышленных биокатализаторов

• «Лестница живых существ» и получаемые с помощью биообъектов фармацевтические препараты (составляющие их основу низкомолекулярные и высокомолекулярные субстанции). Вирусы. Микроорганизмы-прокариоты: эубактерии, актиномицеты; микроорганизмы-эукариоты: дрожжи, плесневые грибы, водоросли, простейшие. Высшие растения. Моллюски. Насекомые. Амфибии. Рептилии. Птицы. Млекопитающие.

• Человек как продуцент низко- и высокомолекулярных корректоров гомеостаза. Человек как продуцент иммунопрепаратов.

• Этические проблемы, связанные с использованием человека как биообъекта и их преодоление с помощью возможностей генной инженерии. Человек как источник генов, экспрессии которых

достигают при введении содержащей эти гены рекомбинантной ДНК в клетки микроорганизмов и культуры тканей.

• Ферменты и мультиферментные комплексы в биотехнологическом производстве.

• Совершенствование биообъектов традиционными методами мутагенеза и селекции

Современные представления о функциональной структуре гена. Оперон. Открытая рамка считывания. Границы между отдельными генами.

• Вариационные ряды. Мутации. Их физическая природа. Спонтанные мутации. Классификация индуцированных мутаций. Делеции. Дупликация генов. Амплификация генов. Точечные мутации. Изменения фенотипа, допустимые при различных видах мутаций.

• Физические мутагены. Механизм их действия. Источники облучения. Техника безопасности.

• Химические мутагены. Механизм действия химических мутагенов.

• Направленный мутагенез (мутагенез *in vitro).*

• Пути снижения трудоемкости отбора мутантов микроорганизмов с повышенной продуктивностью (на примере продуцентов антибиотиков или продуцентов витаминов).

• Направления, в которых целесообразно совершенствовать биообъекты, используемые в биотехнологическом производстве (с приведением конкретных примеров): повышение продуктивности, устойчивость к инфекциям, способность к росту на дешевых и недефицитных средах, улучшение реологических показателей культуральной жидкости (облегчение выделения и очистки целевых продуктов), улучшение свойств применительно к требованиям профессиональной гигиены.

Совершенствование биообъектов методами клеточной и генной инженерии

• Клеточная инженерия применительно к микробным, растительным и животным клеткам.

• Техника протопластирования клеток микроорганизмов. Гипертонические среды. Ферменты, гидролизующие полимеры клеточной стенки прокариот и эукариот.

Фузия протопластов разных штаммов как основа клеточной инженерии. Роль ПЭГ. Контроль регенерации клеток. Обмен хромосомами у эукариот и фрагментами хромосомы у прокариот. Получение гибридных вариантов. Проблема повышения их стабильности.

Примеры создания методами клеточной инженерии гибридных молекул БАВ (антибиотики).

• Протопластирование и активация «молчащих» генов.

• Фузия животных клеток (лимфоцитов) и клеток опухолей. Ее практическое значение.

• Генная инженерия (технология получения рекомбинантной ДНК). Определение. Инновационность подхода к созданию новых продуцентов ЛС и новых биологически активных структур.

• Последовательность операций при работе генного инженера.

• Понятие «вектор» применительно к генной инженерии.

• Конструирование векторов на основе плазмидной или фаговой ДНК. Методы получения компетентных клеток микроорганизмов (прокариот и эукариот).

• Рестриктазы. Специфичность рестриктаз. Рестриктаза EcoR1. «Липкие» концы.

• Процедура встраивания чужеродного гена в вектор. Лигазы. Включение вектора с чужеродным геном в компетентные клетки. Условия обеспечения экспрессии гена и стабильности чужеродного белка.

• Ген-маркер и его функции.

• Техника безопасности при работе с генно-инженерными штаммами на производстве (безопасность на «генетическом» и «физическом» уровнях).

Инженерная энзимология. Иммобилизованные биообъекты в условиях биотехнологического производства

• Инженерная энзимология и повышение эффективности биообъектов (индивидуальных ферментов, ферментных комплексов и целых клеток продуцентов) в условиях производства. Иммобилизованные биообъекты и их многократное использование. Ресурсосбережение. Экологические преимущества. Экономическая целесообразность. Повышение качества лекарственных препаратов (гарантия высокой степени очистки, отсутствие белковых примесей). Нерастворимые носители органической и неорганической природы. Микроструктура носителей.

Иммобилизация за счет образования ковалентных связей между ферментом и носителем. Предварительная активация носителя. Влияние иммобилизации на субстратный спектр и кинетические характеристики фермента.

• Иммобилизация ферментов путем включения в ячейки геля. Органические и неорганические гели. Микрокапсулирование ферментов как один из способов их иммобилизации. Размеры и состав оболочки микрокапсул.

• Иммобилизация целых клеток микроорганизмов и растений. Моноферментные биокатализаторы на основе целых клеток. Внутриклеточная регенерация коферментов. Проблемы диффузии субстрата в клетку и выхода продукта реакции. Пути повышения проницаемости оболочки у иммобилизуемых клеток. Полный синтез целевого продукта иммобилизованными клетками продуцентов при разных методах иммобилизации. Использование ростового цикла для иммобилизации клеток в наиболее продуктивной фазе. Особенности физиологии клеток, находящихся в ячейках геля. Проблемы иммобилизации продуцентов при локализации целевого продукта внутри клетки. Подходы к решению таких проблем с помощью генной инженерии.

• Ферменты как промышленные биокатализаторы. Проблемы иммобилизации и использования в промышленности ферментов, имеющих коферменты. Использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических β-лактамных антибиотиков; трансформации стероидов при разделении рацематов аминокислот на стереоизомеры.

• Создание биокатализаторов второго поколения на основе одновременной иммобилизации продуцентов и ферментов. Объединение в одном реакторе процесса биосинтеза и реакции трансформации. «Системы, открытые для усложнения».

• Биореакторы различных типов для иммобилизованных ферментов и клеток продуцентов в производстве.

Геномика и протеомика. Их значение для современной биотехнологии

• Основные этапы развития генетики. Первая половина XX века - формальная генетика (генетика признаков). Вторая половина XX века - молекулярная генетика (установление молекулярной структуры гена, дифференциация оперона и открытой рамки считывания, установление функций индивидуальных генов). Конец

XX - начало XXI века - геномика (установление молекулярной структуры - последовательности пар нуклеотидов в целостном геноме и общих принципов его структурно-функциональной организации).

• Техника секвенирования. Международные базы данных геномных исследований. Биоинформатика применительно к использованию баз данных по структурной, сравнительной и функциональной геномике. «Модельные» микроорганизмы.

• Геномика и фармация. Инновационные подходы к созданию новых лекарств. Поиск лекарственного агента, начиная с выбора гена, при взаимодействии с продуктами экспрессии которого, предполагается испытывать ряды природных и синтетических соединений как потенциальных лекарств.

Понятие «существенности» (жизненной необходимости) гена.

• Дифференциация генов патогенных микроорганизмов на «house keeping» и «ivi»-гены. Выявление у патогенов новых мишеней для антимикробных лекарственных агентов. Система IVET *(In Vivo Expression Technology)* и отбор новых антимикробных структур.

• Понятие протеома. Протеомика и ее непосредственная связь с функциональной геномикой. Методы протеомики. Ее значение для фармации.

Слагаемые биотехнологического процесса. Основная структура биотехнологического производства лекарственных препаратов

• Различная степень сложности производственных биотехнологических процессов. Ее зависимость от природы биообъекта, целевого продукта, его назначения и лекарственной формы.

Определяющий этап биотехнологического процесса (ферментация). Цех ферментации. Ферментационное оборудование. Конструкция ферментеров. Причины, обусловливающие различия в конструкции.

• Подготовительные операции для проведения биосинтеза. Стерилизация ферментеров и трубопроводов. Метод стерилизации. Проблемы, связанные со стерилизацией ферментационного оборудования. Определение состава питательных сред. Их стерилизация. Проблемы выбора оптимального режима стерилизации конкретных питательных сред. Очистка и стерилизация воздуха, пропускаемого под давлением в ферментер. Схема подготовки потока воздуха, подаваемого в ферментер. Барботажное устрой-

ство. Подготовка посевного материала. Многоэтапность выращивания: в колбах, на качалках, в инокуляторах (посевных аппаратах). Контроль чистоты культуры на каждом этапе. Отличия посевных сред от ферментационных.

• Классификация биосинтеза (ферментационного процесса). По технологическим параметрам. По принципу организации материальных потоков: периодический, полупериодический (управляемый), непрерывный. По функциям целевого продукта в

организме продуцента: первичный метаболит, вторичный метаболит. По аэрируемости питательной среды (глубинная ферментация, поверхностная ферментация).

• Выделение и очистка целевого продукта. Методы отделения биомассы (мицелия) продуцента от растворенного в культуральной жидкости целевого продукта. Методы выделения целевого продукта из культуральной жидкости, освобожденной от мицелия. Методы разрушения клеток продуцента и извлечения целевого продукта при его внутриклеточной локализации. Сходство методов очистки продуктов биосинтеза и органического синтеза на конечных стадиях их получения. Общее в методах создания лекарственных форм препаратов, полученных биотехнологическим и химическим путем.

Молекулярные механизмы внутриклеточной регуляции метаболизма

• Управление биосинтезом первичных и вторичных метаболитов (потенциальных лекарственных веществ).

- Репрессия и индукция синтеза ферментов. Схема Жакоба и Мано. Функциональные участки оперона. Пути воздействия на образование ферментных белков, участвующих в биосинтезе целевого продукта (первичного или вторичного метаболита).

- Ингибирование активности ферментов по принципу обратной связи (ретроингибирование). Аллостерия ферментов. Преодоление явления ретроингибирования генетическими методами и путем подбора питательных сред на примере аминокислот и антибиотиков.

- Строгий *(stringent)* аминокислотный контроль метаболизма. Гуанозинтетрафосфат как биорегулятор. Рибосома как сенсорная органелла. Ассоциированная с рибосомой пирофосфаттрансфераза. Клетки reIA+ и reIA-. Влияние гуанозинтетрафосфата на сродство РНК-полимеразы к промоторам разных генов, влияние на синтез макромолекул и другие

фундаментальные процессы в клетке. Возможность воздействия на систему stringent контроля на синтез аминокислот, пуринов и пиримидинов (как субстанций для лекарственных препаратов).

• Защита рекомбинантных нуклеиновых кислот и белков от нуклеаз и протеаз продуцента.

- Регуляция усвоения азотсодержащих соединений. Глутамин, глутамат, аспартат и их роль в ключевых реакциях обеспечения клетки-продуцента азотом. Глутамин-синтетаза - главная мишень для регуляторных воздействий применительно к конкретным целям биотехнолога. Понятие кумулятивного ретроингибирования. Ингибирование активности глутаминсинтетазы за счет аденилирования. Деаденилирование в зависимости от состава среды. Аммиак (ион аммония) как репрессор синтеза глутамина и его метаболитов (потенциальных лекарственных веществ). Воздействие на биосинтез потенциальных лекарственных веществ путем удаления иона аммония из среды; мутаций, влияющих на аллостерические центры глутамин синтетазы.

Катаболитная репрессия (глюкозный эффект). Два механизма этого явления. Роль 3, 5-аденозинмонофосфата. Отрицательный эффект катаболитной репрессии на синтез многих целевых продуктов, производимых биотехнологическим путем. Противодействие указанному эффекту за счет подбора сред: физиологический уровень или уровень конструирования устойчивых к катаболитной репрессии мутантов - генетический уровень.

- Явление ограниченного протеолиза и возможности его использования.

- Защита клетки-продуцента (суперпродуцента) от образуемых метаболитов с «суицидным» эффектом. Компартментация. Временная (обратимая) ферментативная инактивация с реактивацией при выбросе из клетки.

- Защита в клетке рекомбинанта чужеродных генов и кодируемых этими генами белков от нуклеаз и протеаз хозяина.

Рекомбинантные белки и полипептиды. Получение биорегуляторов с видоспецифичностью для человека путем микробиологического синтеза

• Белковые и полипептидные гормоны, факторы роста тканей, факторы врожденного иммунитета как основа используемых

в медицине лекарственных препаратов. Проблемы дефицита сырья. Иммуногенность препаратов, получаемых из тканей сельскохозяйственных животных.

• Использование методов генной инженерии (технологии получения рекомбинантной ДНК) для переноса в микробные клетки генов человека, кодирующих образование видоспецифичных белковых биорегуляторов. Критерии выбора организма-хозяина. Конструирование рекомбинантных штаммов.

• Генно-инженерный инсулин как лекарственный препарат, технология получения которого широко внедрена в производство. Источники получения инсулина из животного сырья. Отличия инсулина из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота от инсулина человека по аминокислотному составу.

Технология получения инсулина человека на основе использования рекомбинантных штаммов *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae.* Различия в технологических процессах на примере технологии фирмы «Eli Lilly».

Этапы технологического процесса:

• получение генов, кодирующих цепи А и В путем органического синтеза;

• соединение каждого гена (S-конец) через кодон метионина с геном β -галактозидазы;

• встраивание каждой из полученных нуклеотидных последовательностей в отдельную плазмиду;

• введение каждой из плазмид в *E. coli* и получение двух рекомбинантных штаммов *E. coИ* с геном цепи А и геном цепи В;

• выращивание каждого из рекомбинантных штаммов *E. coli* в ферментере на среде с лактозой; индукция синтеза большого количества β-галактозидазы и связанной с ней цепи А или цепи В;

• выделение гибридных белков - β-галактозидазы, метионина, цепи А; β-галактозидазы, метионина, цепи В;

• расщепление химическим путем остатка метионина и выделение цепей А и В, очистка от примесей;

• получение инсулина путем образования в точно определенных местах двух дисульфидных связей между цепью А и цепью В.

- Проблемы создания препаратов инсулина новых поколений (с пролонгированным эффектом и т.д.).

- Контроль за концентрацией инсулина в крови человека (мониторинг). Радиоиммунный анализ (РИА). Принцип метода.

- Гормон роста. Видоспецифичность. Клонирование гена в клетках *E. coli.*

- Эритропоэтин. Фактор созревания эритроцитов. Видоспецифичность. Клонирование гена эритропоэтина человека. Технология получения. Лекарственные формы.

• Интерфероны. Клонирование гена интерферона в клетках *E. coli,* дрожжах.

• Фактор врожденного иммунитета из нейтрофилов человека. Технология получения рекомбинантного N-терминального фрагмента белка с молекулярной массой 21 кДа.

Факторы роста тканей (гормоны, синтезируемые вне желез внутренней секреции). Видоспецифичность. Разработка технологии получения рекомбинантных молекул.

• Рекомбинантные вакцины. Актуальность создания.

• Единая система GLP-GCP и GMP для производства и контроля качества лекарственных веществ (применительно к препаратам, полученным биотехнологическими методами)

• Предклинические испытания лекарств в соответствии с правилами good laboratory practice (GLP): тесты *in vitro* и *in vivo,* стандартизация реагентов, линейные животные и их содержание. Планировка вивария. Обработка результатов. Проблемы выявления видовой токсичности.

• Клиническое изучение лекарств в соответствии с требованиями good clinical practice (GCP). Информация для лиц, получающих испытываемые лекарства. Этические (общественные) комитеты и пределы их полномочий. Правила повышения достоверности результатов клинических испытаний.

• Правила GMP при производстве и контроле качества лекарственных препаратов и их субстанций. Причины введения правил GMP. История разработки и введения правил GMP. Международная организация по сертификации и удостоверению качества лекарств.

• Международные, региональные и национальные правила GMP. Причины их параллельного сосуществования.

• Содержание правил GMP (каждого из разделов) применительно к биотехнологическому производству; причины проведения валидации при замене питательной среды и штамма продуцента.

• Правила GMP и меры безопасности при работе с рекомбинантными штаммами-продуцентами.

• Биотехнология и проблемы экологии

• Эволюция понятия «экология» начиная с XIX века. Определение экологии как науки и ее дифференциация. Нормальная экология и «патологическая экология» (как следствие антропогенных воздействий). Развитие жизни на планете и относительность термина «экологическая опасность».

Сигнально-коммуникативные молекулы надорганизменного уровня - феромоны. Их роль в поддержании экосистем: от микроорганизмов до млекопитающих, их наивысшая физиологическая активность среди известных к настоящему времени БАВ.

• Классификация феромонов. Перспективы производства и использования феромонов в различных областях медицины и сельского хозяйства.

• Методы биотехнологии для ликвидации неблагоприятных последствий антропогенного воздействия на окружающую среду.

• Экологические аспекты биотехнологического производства. Очистка жидких отходов. Биологический способ. Аэротэнки. Активный ил. Штаммы-деструкторы, особенности их использования. Общая схема очистки культуральной жидкости. Уничтожение или переработка твердых отходов (биомассы продуцента после отделения целевого продукта). Стерилизованная биомасса как подкормка для сельскохозяйственных животных. Использование биомассы для повышения прочности некоторых строительных материалов. Липидные фракции из мицелия в качестве пеногасителей. Методы уничтожения газообразных отходов.

• Пути приближения ферментационных процессов в условиях биотехнологического производства к малоотходной технологии.

• Биотехнология будущего. Новые пути развития. Инновационные фармацевтические препараты, получаемые биотехнологическими методами

• Успехи геномики, протеомики и биоинформатики применительно к выявлению и использованию новых мишеней для антимикробных и фармакологически активных лекарств. Таргетный скрининг. Генная терапия, ее современное состояние и перспективы.

• Избыточная активность отдельных генов и пути ее коррекции. Антисмысловые олигонуклеотиды: взаимодействие с конкретным геном и коррекция гомеостаза на уровне транскрипции; взаимодействие с РНК конкретного гена и коррекция гомеостаза на уровне трансляции.

Проблемы защиты антисмысловых олигонуклеотидов от действия нуклеаз; проблемы направленного транспорта (инкапсулирование в липосомы и т.п.).

• Конструирование биокатализаторов на основе модели активных центров ферментов без белковых цепей, обусловливающих иммуногенность ферментов как белков. Получение нового класса корректоров метаболизма.

• Протеомика и белок-белковые взаимодействия в клетке. Инновационные фармацевтические препараты на основе ингибиторов сигнальной трансдукции.

• Завершение международного проекта «Геном человека». Полное секвенирование генома. Индустриализация геномных исследований.

• Проблема совершенствования генома человека; ее мировоззренческие (философские) и этические аспекты. Место и значение фармацевтических препаратов при соответствующих исследованиях.

Частная биотехнология

Культуры растительных клеток и тканей как источник получения лекарственных средств

• Биомасса плантационных и дикорастущих растений - традиционный источник лекарственных веществ. Растущий дефицит сырья. Трудности со сбором сырья в зависимости от климата, времени года, социальных событий в странах, вывозящих сырье. Проблемы нестандартности сырья. Решение ряда экономических, экологических и технологических проблем при культивировании растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах различных конструкций.

• Особенности растительных клеток и тканей, затрудняющих работу с их культурами по сравнению с культурами микроорганизмов. Каллусные и суспензионные культуры клеток растений.

• Понятие тотипотентности растительных клеток и его значение при получении лекарственных веществ. Стабильность продукции вторичных метаболитов и дифференцировка клеток.

Питательные среды для культивирования растительных клеток. Макроэлементы, микроэлементы, источники железа, источники углерода, витамины. Специфические регуляторы роста: ауксины, цитокинины.

• Технологии получения каллусных и суспензионных культур растительных клеток, их преимущества и недостатки в производственных условиях.

• Аппараты для культивирования растительных клеток с различными системами перемешивания и аэрации. Периодический, полупериодический и непрерывный режим ферментации.

• Примеры лекарственных веществ, полученных на основе каллусных и суспензионных культур клеток растений.

• Иммобилизация растительных клеток и ее использование в биотехнологическом производстве. Нерастворимые носители, используемые при иммобилизации растительных клеток. Преимущества технологии, основанной на использовании иммобилизованных растительных клеток по сравнению с технологией, основанной на использовании суспензионных культур. Использование иммобилизованных растительных клеток для целенаправленной биотрансформации лекарственных веществ. Примеры. Преимущество ферментативной трансформации по сравнению с химической.

• Трансгенные растения и перспективы их использования в качестве источника фармацевтических препаратов. Технология получения рекомбинантной ДНК применительно к растительным клеткам. Векторы на основе плазмиды *Agrobacterium tumerfaciens*. Введение чужеродной ДНК с помощью метода «бомбардировки» микрочастицами. Тотипонентность как фактор, способствующий созданию трансгенных растений.

• Трансгенные растения и пищевые продукты.

• Возможность изменения состава и повышения выхода вторичных метаболитов (потенциальных лекарственных агентов) из клеток трансгенных растений.

Антибиотики и корректоры гомеостаза как вторичные микробные метаболиты у высших эукариот

• Почвенные биоценозы и разнообразие составляющих их видов микроорганизмов. Различия по образованию вторичных метаболитов между отдельными штаммами одного вида. Поиск и первичная оценка вторичных метаболитов. Методы скрининга.

• Основные группы микроорганизмов, образующих антибиотики: плесневые грибы (низшие эукариоты), актиномицеты и споровые эубактерии (прокариоты). Особенности структуры их клеток и физиологии.

• Биологическая роль антибиотиков как фактор преодоления стрессовых ситуаций для своего продуцента (ингибиторы роста других микроорганизмов, сигнальные молекулы при перестройке метаболизма в случае дефицита питательных веществ).

• Молекулярный механизм антимикробного действия различных групп антибиотиков и системы защиты продуцентов от образуемых ими антибиотиков. β-Лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и др.) - ингибиторы синтеза пептидогликана

клеточной стенки. Пенициллинсвязывающие белки цитоплазматической мембраны и дифференциация лактамов по биологической активности в зависимости от сродства к отдельным пенициллинсвязывающим белкам. Гликопептидные антибиотики (ванкомицин) - ингибиторы синтеза пептидогликана. Антибиотики полиеновой структуры (амфотерицин В, нистатин и др.) и нарушение молекулярной организации цитоплазматической мембраны плесневых грибов и дрожжей. Антибиотики - ингибиторы белкового синтеза (на уровне рибосомно-матричных систем). Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин и др.): зависимость механизма действия от стадии процесса белкового синтеза (стадия формирования инициационного комплекса, стадия элонгации полипептидной цепи). Летальные белки как результат нарушения считывания генетического кода при трансляции. Тетрациклины (место фиксации - на малой рибосомной субъединице). Макролиды (эритромицин и др.) - реагирование с 23 S-рибосомной РНК в пределах пептидилтрансферазного центра. Антибиотики-ингибиторы белкового синтеза на дорибосомной стадии процесса: мупироцин и др. Антибиотики-ингибиторы синтеза и превращений (суперскручивание ДНК) нуклеиновых кислот. Анзамицины (рифампицин и др.); реагирование с β-субъединицей РНК-полимеразы. Хинолоновые (фторхинолоновые) структуры - аналоги налидиксоновой кислоты; реагирование с ДНК-топоизомеразами II и IV. ДНК-тропные антибиотики, применяемые в онкологической практике: антрациклины, блеомицин, митомицины и др.

Суперпродуценты антибиотиков, используемые в биотехнологическом производстве. Кривая накопления антибиотика в среде и причины ее отставания от кривой накопления биомассы продуцента. Учет этого явления при подборе ферментационных сред. Трофофаза и идиофаза. Выбор времени внесения предшествен-

ников. Сборка углеродного скелета молекулы антибиотиков из первичных метаболитов. Схема биосинтеза β-лактамных антибиотиков (пенициллинов и цефалоспоринов) из аминокислот. Схема биосинтеза стрептомицина и других аминогликозидов (основной предшественник глюкоза). Тетрациклины, макролиды (эритромицин) и поликетидный синтез. Формирование молекулы антибиотиков в мультиферментных комплексах.

• Направленный биосинтез. Получение бензилпенициллина при внесении в среду фенилуксусной кислоты (ФУК). Мутасинтез, блок-мутанты, мутасинтоны, мутасинтетические антибиотики.

Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности

• Изменение конформации внутриклеточных мишеней и их сродства для β-лактамных антибиотиков, аминогликозидов, тетрациклинов, макролидов, анзамицинов. Пенициллинсвязывающие белки и метициллинорезистентность. Инактивация антибиотиков защитными ферментами микроорганизмов. Современная классификация β-лактамаз. Дипептидаза животных тканей. Классификация ферментов, инактивирующих аминогликозиды и макролиды. Системы активного (энергозависимого) выброса антибиотиков из клетки (помпы). Помпы грамотрицательных и грамположительных

бактерий. Множественная лекарственная резистентность (MDR), развивающаяся у опухолевых клеток.

• Генетические основы антибиотикорезистентности. Хромосомная и плазмидная локализация генов резистентности. Полирезистентность. Распространение плазмид, содержащих гены резистентности, путем конъюгации и за счет других механизмов. Транспозоны. Конъюгативные транспозоны. Понятия «инфекционная резистентность» и «госпитальные инфекции».

• Комбинированные препараты β-лактамных антибиотиков с ингибиторами β-лактамаз (клавулановой кислотой, сульбактамом).

• Гликопептидные антибиотики «резерва» и преодоление метициллинорезистентности.

• Антибиотикотолерантность применительно к β-лактамным структурам. Отличие от антибиотикорезистентности. Амикацин - аналог аминогликозидных антибиотиков канамицина и бутирозина^{p}, полученный путем биосинтеза и целенаправленной химической трансформации. Устойчивость к защитным ферментам патогенов: к аминогликозид фосфо-аденилил- и ацетилтрансферазам. Телитромицин - полусинтетический аналог эри-

тромицина, реагирующий с пептидилтрансферазным центром мутантных штаммов патогенов с приобретенной эритромицинорезистентностью. Проблемы скрининга природных и синтетических ингибиторов систем активного выброса ксенобиотиков (помпы).

• Перспективы борьбы с распространением резистентности на уровне конъюгационного переноса плазмид (поиск ингибиторов образования пилей, ингибиторов феромонов и рецепторов феромонов).

• Полусинтетические пенициллины, используемые в клинике. Их различия по фармакокинетическим свойствам, спектру действия, устойчивости к β-лактамазам, сродству к пенициллинсвязывающим белкам. Получение из бензилпенициллина 6-АПК (методом ферментативного гидролиза). Получение полусинтетических пенициллинов методами ферментативного синтеза (биотрансформации 6-АПК). Использование в производственном процессе гидролазы из *E. coli* и синтетазы из *Xanthomonas sp.*Полусинтетические пенициллины (ампициллин, азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин, карбенициллин и т.д.). Четыре генерации полусинтетических цефалоспоринов, внедренных в клиническую практику к настоящему времени. Их различия по биологическим свойствам, включая степень устойчивости к β-лактамазам расширенного спектра действия. Полусинтетические цефалоспорины на основе 7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислоты (исходная структура бензилпенициллин). Схема превращений бензилпенициллина в 7-фенилацетамидооксицефалоспорано- вую кислоту; полусинтетические цефалоспорины (цефалексин и др.). Полусинтетические цефалоспорины на основе 7-ами- нодезацетоксицефалоспорановой кислоты (7-АЦК) (исходная структура цефалоспорин С^{p}). Схема превращения цефалоспорина С^{p} в глутарил-

7-аминоцефалоспорановую кислоту и 7-амино- цефалоспорановую кислоту; полусинтетические цефалоспорины (цефалоридин, цефалотин, цефоперазон, цефамандол и др.). Цефалоспорины четвертого поколения - цефепим, цефпиром. Их преимущества перед другими цефалоспоринами применительно к антибиотикорезистентным штаммам грамотрицательных бактерий. Сочетание биосинтеза, органического синтеза, биологической и химической трансформации при получении новых, перспективных для клинической практики, цефалоспоринов.

Вторичные микробные метаболиты - ингибиторы сигнальной трансдукции

• Биологическая роль в клетках продуцентов. Использование в различных областях медицины. Циклоспорин А и его применение в трансплантологии и для лечения аутоиммунных болезней. Молекулярный механизм действия. Реагирование с циклофилином. Прерывание каскада ответных реакций на антиген на уровне кальцийнейрина.

• Возможность снятия циклоспорином А и его производными MDR фенотипа опухолей и использование его в комбинированной противоопухолевой химиотерапии. Перспективы получения новых представителей семейства циклоспоринов путем направленного биосинтеза.

• Ферменты в заместительной терапии. Ферменты как местно применяемые ЛС. Ферменты в качестве ЛС, вводимых парентерально.

• Механизм каталитического действия, общие свойства и области применения внедренных в медицинскую практику ферментов: L-аспарагиназы, β-галактозидазы, альфа-амилазы, солизима, террилитина, стрептокиназы, трипсина, химотрипсина, пепсина, урокиназы, бромелина, папаина, фицина.

• Принципы классификации протеолитических ферментов, используемых в медицинской и лабораторной практике.

• Микробиологический синтез ферментов как наиболее прогрессивное современное направление создания препаратов на их основе.

• Ферменты и приготовление питательных средств (примеры). Ферменты и разделение рацематов (примеры). Ферменты и определение метаболитов (молочной кислоты и др.). Ферменты при определении стерильности антимикробных лекарственных препаратов (пример). Ферменты и получение полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов.

Фармацевтические препараты на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов (нормофлоры, эубиотики, пробиотики, микробиотики)

Цели и области применения микроорганизмов-симбионтов в медицине, ветеринарии, животноводстве как причина многочисленности названий соответствующих препаратов.

• Понятие симбиоза микроорганизмов. Варианты симбиоза: мутуализм, паразитизм, нейтрализм, комменсализм. Микрофлора

человека. Кожная микрофлора. Микрофлора слизистых оболочек. Микрофлора желудочно-кишечного тракта: полостная и пристеночная. Виды микроорганизмов, доминирующих в кишечнике в период раннего детского возраста. Дальнейший рост количества видов бактерий и грибов; формирование резидентной микрофлоры. Роль резидентной микрофлоры для организма хозяина после колонизации эпителия кишечника.

• Гнилостные бактерии в кишечном тракте. Причина их вредного воздействия на организм хозяина. Патогенные бактерии. Дисбактериоз кишечника и условия, способствующие его развитию (пищевые консерванты, стрессы и т.д.).

• Работы И.И. Мечникова на рубеже XIX-XX веков. Концепция преждевременного старения за счет хронического отравления организма продуктами жизнедеятельности гнилостных бактерий. Предложенный путь борьбы с дисбактериозом с помощью живых культур молочнокислых бактерий.

• Антагонистический эффект молочнокислых бактерий по отношению к гнилостным.

• Кисломолочные продукты и лечебные препараты на основе живых культур бифидо- и молочнокислых бактерий: лактобактерин, бифидумбактерин, колибактерин♠, бификол♠. Их особенности. Технология получения, включая получение длительно хранящихся (сухих) препаратов.

• Расширение сферы применения нормофлоров: использование при острых кишечных инфекциях (дизентерия, сальмонеллез), хронической дисфункции стафилококковой этиологии. Расширение показаний к применению нормофлоров при инфекциях внекишечной локализации. Подходы к решению проблемы совместного использования нормофлоров и антибиотиков.

Аминокислоты. Основы их биотехнологического производства

• Биологическая роль аминокислот. Области применения аминокислот в качестве лекарственных препаратов.

• Химический синтез аминокислот и проблемы стереоизомерии применительно к получению аминокислотных препаратов. Химико-энзиматический синтез аминокислот. Разделение стереоизомеров с использованием ферментативных методов. Микробиологический синтез аминокислот. Виды микроорганизмов, перспективных в качестве потенциальных продуцентов аминокислот.

• Создание суперпродуцентов аминокислот. Особенности регуляции и схемы синтеза различных аминокислот у разных видов микроорганизмов. Мутанты с нарушением систем ретроингибирования синтеза аминокислот, репрессии и индукции синтеза ферментов аминокислотного метаболизма. Генно-инженерные штаммы-продуценты аминокислот с многокопийными плазмидами, содержащими гены, кодирующие ферменты биосинтеза целевых аминокислот.

• Управляемая ферментация с дробной подачей источников углерода и азота при биосинтезе аминокислот. Поддержание оптимального значения pH (pH-статирование смесью аммиачной воды и углеводов). Подбор оптимальной концентрации ростовых факторов в случае применения продуцентов-ауксотрофов. Подходы к снижению образования токсичных для продуцентов аминокислот метаболитов путем лимитирования источников углерода в среде. Пути продления активного периода ферментации: внесение «подпиток» определенного состава и т.д.

Витамины. Микробиологический синтез

• Биологическая роль витаминов. Традиционные методы получения витаминов из растений. Классификация витаминов. Коферменты как производные витаминов. Механизм каталитической активности соответствующих витаминов.

• Микробиологический синтез витаминов группы В. Витамин B_{12}. Его продуценты из рода *Propionibacterium*и условия ферментации. Продуценты витамина B_{12}, получаемые методом генной инженерии. Витамин B_2(рибофлавин). Две коферментные формы (флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид). Продуценты из родов *Eremothecium* и *Ashbya.* Условия ферментации. Конструирование генно-инженерного штамма *Bacillus subtilis* - промышленного продуцента витамина B_2. Витамин B_3 (пантотеновая кислота^p). Коферментная форма витамина - КоА. Продуценты КоА из рода *Brevibacterium.* Витамин РР (никотиновая кислота). Коферментная форма. Микроорганизмыпродуценты из родов *Saccharomyces* и *Brevibacterium.*Витамин С (аскорбиновая кислота). Продуцент витамина С из рода *Gluconobacter*. Технология производственного процесса. Новые пути промышленного биосинтеза аскорбиновой кислоты. Продуценты промежуточных продуктов из родов *Erwinia* и др. Витамины группы D. Эргостерин^p - провитамин D_2 в клетках

Аминокислоты. Основы их биотехнологического производства

• Биологическая роль аминокислот. Области применения аминокислот в качестве лекарственных препаратов.

• Химический синтез аминокислот и проблемы стереоизомерии применительно к получению аминокислотных препаратов. Химико-энзиматический синтез аминокислот. Разделение стереоизомеров с использованием ферментативных методов. Микробиологический синтез аминокислот. Виды микроорганизмов, перспективных в качестве потенциальных продуцентов аминокислот.

• Создание суперпродуцентов аминокислот. Особенности регуляции и схемы синтеза различных аминокислот у разных видов микроорганизмов. Мутанты с нарушением систем ретроингибирования синтеза аминокислот, репрессии и индукции синтеза ферментов аминокислотного метаболизма. Генно-инженерные штаммы-продуценты аминокислот с многокопийными плазмидами, содержащими гены, кодирующие ферменты биосинтеза целевых аминокислот.

• Управляемая ферментация с дробной подачей источников углерода и азота при биосинтезе аминокислот. Поддержание оптимального значения pH (pH-статирование смесью аммиачной воды и углеводов). Подбор оптимальной концентрации ростовых факторов в случае применения продуцентов-ауксотрофов. Подходы к снижению образования токсичных для продуцентов аминокислот метаболитов путем лимитирования источников углерода в среде. Пути продления активного периода ферментации: внесение «подпиток» определенного состава и т.д.

Витамины. Микробиологический синтез

• Биологическая роль витаминов. Традиционные методы получения витаминов из растений. Классификация витаминов. Коферменты как производные витаминов. Механизм каталитической активности соответствующих витаминов.

• Микробиологический синтез витаминов группы В. Витамин B_{12}. Его продуценты из рода *Propionibacterium*и условия ферментации. Продуценты витамина B_{12}, получаемые методом генной инженерии. Витамин B_2(рибофлавин). Две коферментные формы (флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид). Продуценты из родов *Eremothecium* и *Ashbya.* Условия ферментации. Конструирование генно-инженерного штамма *Bacillus subtilis* - промышленного продуцента витамина B_2. Витамин B_3 (пантотеновая кислота[р]). Коферментная форма витамина - КоА. Продуценты КоА из рода *Brevibacterium.* Витамин РР (никотиновая кислота). Коферментная форма. Микроорганизмыпродуценты из родов *Saccharomyces* и *Brevibacterium.*Витамин С (аскорбиновая кислота). Продуцент витамина С из рода *Gluconobacter*. Технология производственного процесса. Новые пути промышленного биосинтеза аскорбиновой кислоты. Продуценты промежуточных продуктов из родов *Erwinia* и др. Витамины группы D. Эргостерин[р] - провитамин D_2 в клетках

Аминокислоты. Основы их биотехнологического производства

• Биологическая роль аминокислот. Области применения аминокислот в качестве лекарственных препаратов.

• Химический синтез аминокислот и проблемы стереоизомерии применительно к получению аминокислотных препаратов. Химико-энзиматический синтез аминокислот. Разделение стереоизомеров с использованием ферментативных методов. Микробиологический синтез аминокислот. Виды микроорганизмов, перспективных в качестве потенциальных продуцентов аминокислот.

• Создание суперпродуцентов аминокислот. Особенности регуляции и схемы синтеза различных аминокислот у разных видов микроорганизмов. Мутанты с нарушением систем ретроингибирования синтеза аминокислот, репрессии и индукции синтеза ферментов аминокислотного метаболизма. Генно-инженерные штаммы-продуценты аминокислот с многокопийными плазмидами, содержащими гены, кодирующие ферменты биосинтеза целевых аминокислот.

• Управляемая ферментация с дробной подачей источников углерода и азота при биосинтезе аминокислот. Поддержание оптимального значения pH (pH-статирование смесью аммиачной воды и углеводов). Подбор оптимальной концентрации ростовых факторов в случае применения продуцентов-ауксотрофов. Подходы к снижению образования токсичных для продуцентов аминокислот метаболитов путем лимитирования источников углерода в среде. Пути продления активного периода ферментации: внесение «подпиток» определенного состава и т.д.

Витамины. Микробиологический синтез

• Биологическая роль витаминов. Традиционные методы получения витаминов из растений. Классификация витаминов. Коферменты как производные витаминов. Механизм каталитической активности соответствующих витаминов.

• Микробиологический синтез витаминов группы В. Витамин B_{12}. Его продуценты из рода *Propionibacterium*и условия ферментации. Продуценты витамина B_{12}, получаемые методом генной инженерии. Витамин B_2(рибофлавин). Две коферментные формы (флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид). Продуценты из родов *Eremothecium* и *Ashbya.* Условия ферментации. Конструирование генно-инженерного штамма *Bacillus subtilis* - промышленного продуцента витамина B_2. Витамин B_3 (пантотеновая кислота[р]). Коферментная форма витамина - КоА. Продуценты КоА из рода *Brevibacterium.* Витамин РР (никотиновая кислота). Коферментная форма. Микроорганизмыпродуценты из родов *Saccharomyces* и *Brevibacterium.*Витамин С (аскорбиновая кислота). Продуцент витамина С из рода *Gluconobacter*. Технология производственного процесса. Новые пути промышленного биосинтеза аскорбиновой кислоты. Продуценты промежуточных продуктов из родов *Erwinia* и др. Витамины группы D. Эргостерин[р] - провитамин D_2 в клетках

дрожжей и плесневых грибов. Витамин А. Микробиологический синтез β-каротина. Продуценты. Убихиноны (коферменты Q). Источники получения: растительные ткани и микробная биомасса. Методы генной инженерии применительно к созданию продуцентов убихинонов Q_9 и Q_{10}.

Иммунобиотехнология как один из разделов биотехнологии

• Основные составляющие и пути функционирования иммунной системы. Иммуномодулирующие агенты: иммуностимуляторы и иммуносупрессоры (иммунодепрессанты).

• Усиление иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов. Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов или живых гибридных носителей. Антисыворотки к инфекционным агентам, к микробным токсинам. Технологическая схема производства вакцин и сывороток. Неспецифическое усиление иммунного ответа. Рекомбинантные интерлейкины, интерфероны и др. Механизмы биологической активности. Химические факторы. Трансплантация костного мозга.

• Подавление иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов. Рекомбинантные антигены. IgE-связывающие молекулы и созданные на их основе толерогены. Иммунотоксины. Антиидиотипические антитела в качестве мишени для аутоантител. Специфическая плазмоиммуносорбция. Неспецифическое подавление иммунного ответа. Моноклональные антитела против цитокинов. Неспецифичная гемосорбция и иммуноплазмоферез.

• Медиаторы иммунологических процессов. Их функциональная совокупность. Обеспечение гомеостаза. Технология получения рекомбинантной ДНК и медиаторов иммунологических процессов.

• Производство моноклональных антител и использование соматических гибридов животных клеток. Механизмы иммунного ответа на конкретный антиген. Разнообразие антигенных детерминант. Гетерогенность (поликлональность) сывороток. Преимущества использования моноклональных антител. Клоны клеток злокачественных новообразований. Слияние с клетками, образующими антитела. Гибридомы. Криоконсервирование. Банки гибридом. Технология производства моноклональных антител.

Области применения моноклональных антител. Методы анализа, основанные на использовании моноклональных антител (в отдельных случаях поликлональных). Иммуноферментный

анализ. Метод твердофазного иммуноанализа *(ELISA - enzyme linked immuno sorbent assay)*. Радиоиммунный анализ. Преимущества перед традиционными методами при определении малых концентраций тестируемых веществ и наличии в пробах примесей с близкой структурой и сходной биологической активностью. ДНК и РНК-зонды как альтернатива ИФА и РИА при скрининге продуцентов БАВ (обнаружение генов вместо продуктов их экспрессии). Моноклональные антитела в медицинской диагностике. Тестирование гормонов, антибиотиков, аллергенов и т.д. Лекарственный мониторинг. Ранняя диагностика онкологических заболеваний. Моноклональные антитела в лечении и профилактике. Перспективы высокоспецифичных вакцин, иммунотоксинов. Типирование подлежащих пересадке тканей. Моноклональные антитела как специфические сорбенты при выделении и очистке биотехнологических продуктов.

Тематический план лекций

• Введение в биотехнологию. История развития. Биотехнология ЛС. Связь биотехнологии с фундаментальными науками второй половины XX века. Биомедицинские технологии (понятие). Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств. Макроорганизмы, микроорганизмы. Ферменты как промышленные биокатализаторы.

• Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции. Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии. Создание новых биообъектов методами

клеточной и генной инженерии (технологии получения рекомбинантной ДНК). Последовательность операций, осуществляемых биотехнологомгенным инженером.

• Геномика и ее значение для поиска новых лекарств. Структурная, сравнительная и функциональная геномика. Международные базы данных и их использование через компьютерную сеть Интернет. Протеомика, ее методы и значение для поиска новых лекарств. Слагаемые биотехнологического процесса. Структура биотехнологического производства. Ферментеры. Технологические параметры биосинтеза.

• Инженерная энзимология. Иммобилизованные клетки и ферменты в биотехнологическом производстве

Биореакторы. Реком-

бинантные белки и полипептиды. Инсулин. Интерфероны. Гормон роста. Эритропоэтин. Пептидные факторы роста. Видоспецифичность. Традиционные и генно-инженерные методы получения. Особенности контроля качества. Методы определения (применительно к инсулину).

• Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов, используемых в качестве ЛС. Управление процессом. Механизмы регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Управление процессом.

• Единая система GLP, GCP и GMP при внедрении в практику и производство лекарственных препаратов. Особенности GMP применительно к биотехнологическому производству. Иммунобиотехнология. Иммунные сыворотки. Вакцины.

• Рекомбинантные вакцины.

• Биотехнология при решении проблем экологии и ликвидации антропогенных воздействий на среду. Сигнальнокоммуникативные молекулы. Феромоны и др. Их роль в экологических процессах. Возможности использования. Перспективы развития биотехнологии в XXI века. Сочетание биосинтеза, органического синтеза, химической и биологической трансформации при создании современных ЛС. Биотехнологические продукты новых поколений.

Часть тем программы вынесена на самостоятельное изучение, так как в учебниках и монографиях они достаточно широко освещены.

Таблица 13. Тематический план лекций (в часах)

№	Тема лекций	Количество часов
1	Введение в биотехнологию. Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств	2
2	Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции. Создание новых биообъектов методами клеточной и генной инженерии (технологии получения рекомбинантной ДНК)	2
3	Геномика и ее значение для поиска новых лекарств. Слагаемые биотехнологического процесса	2
4	Инженерная энзимология. Рекомбинантные белки и полипептиды	2

Окончание таблицы 13

5	Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов, используемых в качестве ЛС. Механизмы регуляции биосинтеза вторичных метаболитов	2
6	Единая система GLP, GCP и GMP при внедрении в практику и производство лекарственных препаратов. Иммунобиотехнология	2
7	Биотехнология при решении проблем экологии и ликвидации антропогенных воздействий на среду. Перспективы развития биотехнологии в XXI веке	2

Тематический план практических занятий и семинаров

• Скрининг продуцентов БАВ (антибиотики, ингибиторы ферментов, иммунодепрессанты и др.) из почвенных микроорганизмов. Последовательность стадий. Определение антимикробной активности антибиотиков.

• Регуляция биосинтеза БАВ в условиях производства. Ферментаторы (ферментеры). Решение ситуационных задач (при нарушении оптимальных условий биосинтеза).

Методы иммобилизации ферментов и целых клеток. Получение 6-АПК из пенициллина. Коллоквиум. Письменный и устный опрос. Семинарское занятие.

• Получение лекарственных веществ на основе растительных культур тканей. Культивирование растительных клеток. Каллусные и суспензионные культуры. Методы получения и контроля культур.

• Получение аминокислот биотехнологическими методами. Конструирование штаммов-продуцентов и оптимизация условий ферментации.

• Нормофлоры. Выращивание. Контроль. Суспензия клеток. Лиофильно высушенные препараты. Коллоквиум. Письменный и устный опрос. Семинарское занятие. Зачет.

Таблица 14. Тематический план практических занятий (в часах)

№	Тема практических занятий	Количество часов
1	Скрининг продуцентов БАВ из почвенных микроорганизмов. На занятии выполняется лабораторная работа «Поиск и характеристика микроорганизмов-продуцентов антибиотиков»	2,5
2	Регуляция биосинтеза БАВ в условиях производства. На занятии выполняется лабораторная работа «Определение оптимальных параметров ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина»	2,5
3	Методы иммобилизации ферментов и целых клеток. На занятии выполняется лабораторная работа «Иммобилизация клеток *E. coli* — продуцента пенициллинацилазы — и получение 6-АПК путем гидролиза бензилпенициллина иммобилизованными клетками»	3
4	Получение лекарственных веществ на основе растительных культур тканей. На занятии выполняется лабораторная работа «Получение каллусной культуры клеток и оценка ее качества»	2,5
5	Получение аминокислот биотехнологическими методами. На занятии выполняется лабораторная работа «Ферментация треонина; идентификация и определение содержания этой аминокислоты в культуральной жидкости»	2,5
6	Нормофлоры. Выращивание. Контроль. На занятии выполняется лабораторная работа «Определение концентрации жизнеспособных клеток лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, а также активной и титруемой кислотности культуральной жидкости»	3

Практические занятия по биотехнологии проводят по схеме, максимально отражающей условия производства, что позволяет проследить весь биотехнологический процесс производства ЛС.

Контрольные работы

Контрольная работа ? 1 Темы

Современная биотехнология. Биообъект. Биотехнологический процесс. Мутагенез, селекция. Клеточная инженерия. Генная инженерия. Инженерная энзимология. Механизмы внутриклеточной регуляции. Геномика. Протеомика. Правила GMP.

Вариант 1

1. Укажите, какие препараты из нижеперечисленных относятся в биотехнологическом производстве к собственно ЛС.

• Аминокислоты.

• Вакцины.

• Антибиотики.

• Биосенсоры.

2. Соедините нижеприведенные целевые продукты биотехнологического производства с соответствующими источниками их получения, имея в виду, что эти биообъекты из группы эукариот: антибиотики, противоопухолевые препараты, альгинаты, эргостерин.

• Клетки дрожжей.

• Клетки водорослей.

• Клетки простейших.

• Клетки плесени.

• Клетки бактерий.

3. Соедините биотехнологическое производство (как этап или весь процесс) с функционированием биообъекта в конкретном случае:

биотехнология - это базовый этап получения ЛС;

• биотехнология - это промежуточный этап (этапы) получения ЛС;

• биотехнология - это весь процесс изготовления ЛС, профилактических и диагностических препаратов:

- биообъекты (биообъект) используют для биотрансформации;

- биообъект функционирует на всех стадиях производства;

- биообъект применяют в качестве поставщика сырья;

- биообъект функционирует как биокатализатор.

4. Напишите продукты превращения в биотехнологическом производстве для:

• сорбита;

• ситостерина^{p};

• фумаровой кислоты.

Отметьте этап биотехнологического производства, соответствующий этим превращениям.

5. Развитие популяции микрообъектов обычно включает несколько фаз. Укажите, что означает каждая фаза такого процесса.

• Индукционный период (лаг-фаза).

• Экспоненциальный рост.

• Линейный рост.

• Замедленный рост.

• Стационарная фаза:

- без заметного увеличения числа клеток;

- равномерный рост биокультуры;

- накопление биомассы и продуктов биосинтеза;

- режим постоянства числа жизнеспособных особей;

- замедление роста;

- прекращение роста.

Изобразите графическую зависимость скорости размножения биообъекта в техногенной системе от концентрации компонента питательной среды. Укажите название графических областей на рисунке.

6. Какой процесс ферментации следует считать наиболее целесообразным, если конечным продуктом является непосредственно вторичный метаболит?

• Периодический.

• Полупериодический.

• Непрерывный.

• Отъемно-доливной.

Приведите пример получения БАВ при таком процессе.

7. Решая задачи по проблеме увеличения целевого продукта, в настоящее время активно используют генную инженерию. Укажите суть собственно генной инженерии в определениях, представленных ниже:

воссоединение фрагментов ДНК *(in vitro);*

• воссоединение фрагментов ДНК (in vivo);

• конструирование новых рекомбинантных структур;

• введение новых рекомбинантных структур в клетку.

Какой принцип лежит в основе создания любых рекомбинантных белков?

8. Наследственные изменения называют мутациями, они проявляются на субклеточном и молекулярном уровнях. Соедините каждое изменение ДНК с его функциональным определением:

• делеция;

• дупликация;

• амплификация;

• инверсия;

• транспозиция:

- изменение порядка расположения генов в хромосоме;

- удвоение генов;

- вставка новых участков хромосом;

- умножение количества генов;

- выпадение отдельных генов или участков хромосом;

- уменьшение количества генов. Напишите определение точечной мутации.

9. В клеточной инженерии при создании новых структур (грибы, бактерии) для увеличения выхода целевого продукта требуются следующие операции, а какие именно, выберите:

• удаление клеточной стенки;

• слияние клеток;

• разделение клеток с обменом участками хромосом;

• разделение клеток без обмена участками хромосом. Напишите, чем обрабатывают клетки прокариот и эукариот

с целью удаления клеточной стенки на примере получения гибридных клеток в процессе получения антибиотика.

10. В генной инженерии большое значение имеют внехромосомные факторы наследственности. Укажите эти факторы, выбирая из нижеприведенных вариантов:

• нуклеотиды;

• нуклеозиды;

• плазмиды;

• фаги;

• космиды.

Напишите, что представляют собой плазмиды и космиды.

11. Укажите, что из нижеперечисленного можно отнести к отдельным этапам клеточной инженерии:

• получение плазмид;

• получение фагов;

• слияние протопластов;

• получение гибридом.

Опишите схему получения гибридом.

12. Что из нижеперечисленного относится к регуляции массообмена в ферментере?

• Штуцер для слива культуральной жидкости.

• Ряд вводов для подачи питательной среды.

• Устройства по вводу и выводу воздуха.

• Механическая мешалка.

• Барботер.

13. Что можно отнести к классификации биосинтеза в части ферментации по принципу организации материальных потоков?

• Поверхностную ферментацию.

• Периодическую ферментацию.

• Глубинную ферментацию.

• Полупериодическую ферментацию. Приведите кратко их функциональные отличия.

14. Структурная геномика характеризует ген по нижеприведенным показателям:

• молекулярной массе;

• степени гомологии родственных генов;

• количеству генов;

• нуклеотидной последовательности в каждом гене. Напишите, при помощи каких технологий решают вопрос о результатах идентификации генов.

15. Укажите, как происходит стерилизация в биотехнологическом производстве, если это касается технологического воздуха, среды и оборудования:

- химическим способом;
- острым паром;
- мембранным фильтрованием;
- с использованием дистиллированной воды.

16. Укажите, что из нижеперечисленного имеет особенно важное значение по правилам GMP в производстве пенициллинов и цефалоспоринов:

- размеры помещения;
- расположение помещения;
- санитарно-технические требования к помещениям;
- изоляция помещений. Обоснуйте ответ.

Вариант 2

1. Укажите, что из нижеперечисленного относится в биотехнологическом производстве к профилактическим средствам (препаратам):

- гормоны;
- интерфероны;
- иммуномодуляторы;
- иммунные диагностикумы.

2. Соедините нижеприведенные целевые продукты биотехнологического производства с источниками их получения:

Продукты:

- витамин B_{12};
- дифтерийный анатоксин;
- фумаровая кислота. Соединить с:
- бактериями;
- мицелиальными грибами;
- коринебактериями;
- вирусами.

3. В чем заключается отличие гена эукариота от гена прокариота?

4. Создание питательной среды для микроорганизмов (бактерии, дрожжи, грибы) требует содержания в биообъектах определенных элементов. Укажите наиболее подходящее сочетание таких элементов из приведенных ниже:

- углерод;
- водород;
- фосфор;
- азот;
- азот, кислород;
- азот, калий;
- азот, натрий. Обоснуйте свой выбор.

5. Что является вариантами процесса периодической ферментации?

- Отъемно-доливной.
- Полупериодический.
- Непрерывный.
- Многоциклический.

Напишите, в каких случаях удобно применять такую ферментацию.

6. Укажите фенотипические свойства биообъектов, используемые для совершенствования продуцентов:

- продуктивность;
- использование дешевых питательных сред;
- повышение потребности в аэрации;
- снижение потребности в аэрации;
- устойчивость к фагам;
- соответствие условиям промышленного производства и гигиене.

Напишите, какие свойства имеют в виду, если говорят о соответствии продуцента условиям промышленного производства и ги гиене.

7. Укажите, как в клеточной инженерии решают проблему сохранения целостности протопластов:

- Используя механическое давление.

- Используя осмотическое давление.
- Используя гипертоническую среду.
- Используя добавление вязких веществ.
- Используя добавление антиоксидантов.

Напишите, какие компоненты используют и в каких концентрациях.

8. Одна из стадий работы в области генной инженерии относится к конструированию синтетического или модификации природного гена. Укажите порядок конструирования нуклеотида.

. Расшифруйте термины: вектор, рестриктазы, липкие концы, лигазы, ген-маркер, компетентные клетки, экзон, интрон и объясните их значение.

10. Выберите из нижеперечисленного функцию «компетентности» клеток реципиента:

- принятие новой генетической информации;
- интеграция ее в своем геноме;
- передача генной информации;
- модификация генной информации.

Напишите, как осуществляется ввод новой генной информации в *E. mli,* т.е. укажите пути введения.

11. Биотехнологическое производство имеет различную степень сложности, обусловленную слагаемыми конкретного биотехнологического процесса. В частности, эти сложности могут возникать по причине:

- самого продуцента;
- конечного продукта;
- использования воздуха с улицы (вне завода);
- проведения плановой валидации.

Приведите примеры продуцентов, используемых в биотехнологическом производстве.

12. Каковы оптимальные объемы питательной среды для подачи ее в ферментер?

- Полностью (на весь объем ферментера).
- На 1/3.
- На 1/2.

- На 2/3.

Ответ обоснуйте.

13. Что из нижеприведенного создает наибольшие проблемы по соблюдению стерильности биотехнологического процесса, учитывая его многоэтапность:

- объем ферментера;
- сложность состава среды в ферментере;
- большой объем пропускаемого через ферментер воздуха;
- посевной материал. Ответ обоснуйте.

14. Наиболее гибким и широко распространенным способом контроля метаболизма в клетке является регуляция активности ферментов по принципу:

- прямой связи;
- обратной связи;
- косвенной связи;
- связь не имеет значения.

Ответ обоснуйте на конкретном примере.

15. Процессы биосинтеза многих первичных метаболитов характеризуются тем, что конечный продукт данного биосинтетического пути:

при повышении его концентрации подавляет активность первого фермента этого пути;

- при повышении его концентрации повышает активность первого фермента этого пути;
- при понижении его концентрации подавляет активность первого фермента этого пути;
- не влияет на активность первого фермента этого пути при повышении его концентрации.

16. Укажите, как можно оптимизировать снабжение ферментационного процесса кислородом.

- Изменением режима работы мешалки.
- Скоростью подачи воздуха.
- Содержанием растворенного в культуральной жидкости кислорода.
- Временем ферментации.

17. Укажите требования по экологической безопасности в правилах GMP:

• предотвращение попадания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков в стоки и газовоздушные выбросы;

• исключение попадания аллергенов - продуктов микробиологического синтеза - в атмосферу;

• исключение сброса отходов производства со сточными водами, влияющими на природный биоценоз;

• проверка определенных видов сырья на пирогенность.

Вариант 3

1. Укажите, что из нижеперечисленного относится в биотехнологическом производстве к диагностическим препаратам:

• ферменты;

• нормофлоры;

• препараты на основе моноклональных антител;

• препараты на основе иммобилизованных клеток. Приведите примеры таких лекарственных препаратов.

2. Какие стадии биотехнологического процесса относят к основным?

• Выращивание посевной среды.

• Стерилизацию воздуха, оборудования, питательной среды.

• Ферментацию.

• Выделение и очистку целевого продукта.

3. Укажите свойства биообъекта, которыми он должен обладать в искусственных условиях культивирования:

• упругостью материала;

• пластичностью материала;

• способностью образовывать метаболиты в случае любого синтеза;

способностью образовывать метаболиты только в случае направленного синтеза.

4. Напишите, какие требования предъявляют к биообъекту по части совершенствования его свойств для масштабирования производства ЛС.

5. Перечислите методы стерилизации, применяемые на биотехнологическом производстве по отношению к:

- помещениям;
- оборудованию;
- питательным средам.

6. Выстроите последовательность технологической цепочки получения БАВ из естественного растительного сырья:

- стабилизация;
- концентрирование;
- выделение и очистка продукта;
- контроль качества сырья;
- приготовление готовой формы лекарственного прапарата.

7. Соедините указанные ниже объекты с характером их активности. Биообъекты с информационной активностью.

Биообъекты с каталитической активностью. Соединить с:

- ферментами;
- полисахаридами;
- биологическими макромолекулами;
- вирусами.

8. Какой из нижеперечисленных ферментационных процессов не требует выращивания нового посевного материала, подготовки и стерилизации ферментера и трубопроводов?

- Полупериодический.
- Периодический.
- Отъемно-доливной.
- Многоциклический. Объясните ваш выбор.

9. В клеточной инженерии с помощью метода слияния протопластов созданы микробные штаммы с высокой скоростью роста и большим выходом целевого продукта (в частности, антибиотиков). Применительно к клеткам животных близкий метод известен как «гибридомная технология». Укажите правильное определение понятия «гибридома»:

- клеточные линии, получаемые от слияния нормальных лимфоцитов и миеломных опухолевых клеток;
- клеточные линии, получаемые от слияния лимфоцитов;

• клеточные линии, получаемые от слияния миеломных опухолевых клеток;

клеточные линии, получаемые от слияния лейкоцитов и миеломных опухолевых клеток.

Напишите, какие черты клеток родителей наследует гибридома.

10. Нарисуйте схему расщепления двухцепочечной ДНК рестриктазой EcoR l с участием в месте распознавания гуанина (G), аденина (A), тимина (T), цитозина (C). Укажите на рисунке место действия рестриктазы EcoR 1.

Ответьте, почему генного инженера больше интересуют рестриктазы, расщепляющие одну из двух комплементарных нитей ДНК, но не две сразу? Приведите классификацию иммобилизованных биообъектов по технологическим параметрам.

11. Один из вариантов использования биообъекта из микромира для получения ЛС заключается в иммобилизации. Укажите, какая связь из нижеперечисленных является наиболее прочной при иммобилизации биообъекта.

• Ионная.

• Водородная.

• Ковалентная.

• Сорбционная.

12. Приведите классификацию иммобилизованных биообъектов по технологическим параметрам. Напишите, какие преимущества имеют иммобилизованные биообъекты в биотехнологическом производстве лекарственных препаратов.

13. Сравнительная геномика:

• изучает количественный состав генов;

• изучает нуклеотидную последовательность в каждом гене;

• изучает степень гомологии родственных генов;

• ведет поиск ингибиторов белкового продукта, кодируемого изучаемым геном.

Напишите, как можно использовать сравнительную геномику при решении проблемы безопасности ЛС.

14. В определенных случаях активность ферментов в клетке регулируется по принципу обратной связи (ретроингибирование), что соответственно влияет на интенсивность процесса биосинтеза, который зависит от скорости потребления в клетке:

• начального продукта;

• конечного продукта;

- промежуточного продукта;

питательной среды.

Приведите пример влияния ретроингибирования на выход целевого продукта в биосинтезе ЛС.

15. Укажите, что включает в себя управление ферментационным процессом (регулируемый биосинтез):

- выбор продуцента;
- поддержка оптимальной скорости роста продуцента;
- поддержание критической биомассы;
- поддержание оптимального значения pH культуральной жидкости;
- добавление в начале ферментации предшественника целевого продукта;
- добавление предшественника целевого продукта в начале идиофазы.

16. Укажите, с чем связаны правила GLP.

- С организацией научно-исследовательской работы.
- С организацией работы контрольно-аналитических лабораторий.
- С организацией предклинических лабораторных испытаний.
- С организацией клинических испытаний. Приведите расшифровку понятия «GLP».

Вариант 4

1. Соедините название каждого вида сырья с названием продукта, получаемого из него методами биотехнологии:

- почки и побеги тополя;
- смола сосны;
- цветки ромашки;
- смола пихты. Соединить с:
- бальзамом;
- простагландинами;
- скипидаром;
- эфирным маслом;

- тропановыми алкалоидами.

Приведите схему биотехнологического производства.

2. Соедините задачу увеличения масштабов биотехнологического производства нижеприведенных лекарственных препаратов с использованием конкретных методов их получения.

Препараты:

- сыворотки;
- ЛС растительного происхождения;
- антибиотики.

Методы:

- селекция промышленно-ценных штаммов микроорганизмов;
- отбор высокопродуктивных вариантов растений;
- выбраковка иммунонереактивных доноров;
- увеличение площадей плантационных культур.

Какие проблемы экологии решает биотехнология и каким образом?

3. Укажите требования к биообъекту в биотехнологическом производстве:

- быть источником энергии;
- быть стабильным в экологической нише;
- иметь защиту от внешних возмущений;
- нейтрализовывать изменения pH;
- иметь неизменяемые свойства.

Какие свойства биообъекта соответствуют требованиям промышленного производства?

4. Какие стадии биотехнологического процесса относят к подготовительным?

- Выращивание посевной среды.
- Стерилизацию воздуха, оборудования, питательной среды.
- Ферментацию.
- Биокатализ.

• Выделение целевого продукта и его очистку. Нарисуйте схему выращивания посевной среды.

5. Выберите стерилизующую дозу ионизирующего облучения в мегарадах (Мрад):

• 1,0;

• 2,0;

• 2,5;

• 3,0.

Напишите, за какое время можно набрать оптимальную дозу облучения, если источником являются γ-лучи от Co^{50} или быстрые электроны.

6. Укажите, какие преимущества имеет мицелий продуцента, иммобилизованный в гель:

• соблюдается экологичность производства;

• пролонгирует процесс биосинтеза антибиотика;

• экономит время процесса биосинтеза;

• снижает токсичность антибиотика.

Перечислите методы иммобилизации. Укажите их преимущества перед традиционным производством.

7. Укажите, что относится к параметрам, измеряемым в процессе ферментации:

• вязкость культуральной жидкости;

• концентрация целевого продукта;

• морфология мицелия;

• кислотность среды.

Напишите, какие параметры режима работы ферментера необходимо задать в начале ферментации.

8. Укажите, какими методами фильтрации или центрифугирования осуществляют на производстве отделение нативного раствора от мицелия и коллоидных частиц.

• Применяют стеклянные фильтры.

• Применяют бумажные фильтры.

Применяют барабанные вакуум-фильтры.

• Применяют сепараторы.

Напишите, как ликвидируют твердые и жидкие отходы биотехнологического производства.

9. Укажите наиболее полное понятие генной инженерии как способа:

• получения рекомбинантных белков;

• соединения фрагментов ДНК *(in vitro);*

• соединения фрагментов ДНК *(in vivo);*

• введения новых рекомбинантных структур в живую клетку. Приведите схему образования рекомбинантного инсулина по технологии «E1i Lilly»

10. Укажите, какие свойства клетки-реципиента из нижеперечисленных являются необходимыми для получения положительных результатов в генной инженерии:

• большая масса клетки;

• отсутствие патогенности;

• отсутствие токсичности;

• стабильность суспензии высокой плотности;

• стабильность суспензии низкой плотности;

• секреция эндопродуктов в питательную среду.

11. Укажите свойства биообъектов, используемые для совершенствования продуцентов.

• Продуктивность.

• Использование дешевых питательных сред.

• Устойчивость к микроорганизмам.

• Пониженное потребление кислорода.

• Повышенное потребление кислорода.

• Соответствие правилам промышленного производства и гигиены. Приведите пример использования мутасинтеза в создании новых ЛС.

Сформулируйте понятие «плазмида» из следующих слов: клетка, реципиент, фактор, наследственность, способность реплицироваться, внехромосомный. Объясните, что значит «реплицироваться».

12. Соедините каждый нижеприведенный объект с функцией последовательной технологической операции при трансформации *E. coli.*

Объекты:

• штамм-реципиент;

• аликвотная проба;

• смесь популяции реципиента с вектором;

• клетки с вектором устойчивости к антибиотику;

клоны. Функции:

• разведение, аэрация, добавление включенной в плазмиду ДНК донора;

• концентрирование, аэрация, добавление включенной в плазмиду ДНК донора;

• выращивание на жидкой питательной среде в условиях аэрации;

• высев на твердую питательную среду с ампициллином;

• высев на чашки Петри, инкубация, разведение;

• интенсивная продукция белка, кодирующий ген которого введен в штамм реципиента вместе с вектором.

Дайте определение клона и вектора.

13. По Жакобу и Мано репрессор - это аллостерический белок, содержащий:

• один специфический центр;

• два специфических центра;

• три специфических центра;

• ни одного специфического центра. Приведите модель оперона.

14. Укажите, что из нижеперечисленного имеет особое значение при производстве β-лактамных антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины) в соответствии с требованиями GMP:

• размеры помещения;

• расположение помещений;

• санитарно-технические требования к помещениям;

• максимальная изоляция помещений. Ответ обоснуйте.

Вариант 5

1. Подберите к названию каждого лекарственного продукта, получаемого биотехнологическим методом, соответствующее название сырья.

Лекарственные продукты:

- изохинолиновые алкалоиды;
- токоферолы;
- тропановые алкалоиды;
- камфора;
- каротиноиды. Сырье:
- листья белены черной;
- семена мака снотворного;
- плоды облепихи крушиновидной;
- древесина и корни камфорного дерева;
- цветки ромашки.

Приведите классификацию биообъектов для получения ЛС.

2. Что отличает грамположительные бактерии от грамотрицательных?

- Цитоплазматическая мембрана.
- Клеточная оболочка.
- Внешняя мембрана.

Напишите, ферменты каких бактерий из вышеназванных являются наиболее активными при атаке их антибактериальными средствами и почему.

3. На основе химерных объектов можно организовать фармацевтическое производство субстанций с биологической активностью (белки, гликопротеиды и полипептиды). Соедините наименование субстанции с назначением.

Субстанции:

- эритропоэтин;
- γ-интерферон;
- интерлейкины;
- фактор роста эпителия;
- эндорфины;
- энкефалины.

Назначение:

- противоинфекционные;
- иммуномодулирующие;
- обезболивающие;
- для процесса регенерации;
- при анемии;
- при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Напишите, как осуществляют отбор высокопродуктивных химерных клонов.

4. Биотехнологическое производство ксилита предусматривает использование соответствующих биообъектов. Выберите эти биообъекты из нижепредставленных:

- рис;
- хлопок;
- рисовая лузга;
- хлопковая шелуха.

Приведите определение биообъекта в соответствии с его функциональной активностью.

5. Термолабильные компоненты питательной среды сохраняются лучше, если выбрать оптимальный вариант стерилизации, то есть:

- понизить температуру и увеличить время стерилизации;
- повысить температуру и уменьшить время стерилизации;
- повысить температуру без изменения времени;
- увеличить время стерилизации без изменения температуры. Напишите, какие компоненты питательной среды обеспечивают

успех биосинтеза.

6. Аллостерические эффекторы могут:

- ингибировать аллостерические ферменты;
- активировать аллостерические ферменты;
- координировать метаболические процессы;
- сопровождать образование ковалентной связи.

7. Методами генной инженерии *in vitro* получена новая структура (вследствие соединения фрагментов ДНК). Укажите, какие способности она проявляет:

• кодирование образования белка;

• кодирование образования низкомолекулярного метаболита;

кодирование образования витамина;

• кодирование образования полисахаридов. Напишите, что означает понятие «кодирование продукта».

8. Среди воздействий, оказывающих мутагенный эффект на штамм продуцента, могут быть:

• аэрация;

• рентгеновское излучение;

• УФ-лучи;

• обработка химическими соединениями.

Напишите на примере повышения продуктивности продуцента пенициллина, какие мутагены были применены при получении мутантного клона этого продуцента.

9. Укажите, благодаря чему могут образовываться новые продукты с гибридными структурами при протопластировании и регенерации протопластов.

• Удаление клеточной стенки.

• Фузия (слияние) протопластов.

• Инкубация протопластов.

• При добавлении ПЭГ.

Нарисуйте схему получения протопластов.

10. Соедините функциональные способности плазмиды и ее возможности в генной инженерии. Что такое «ген-маркер», каково его применение (на конкретном примере)?

11. При вводе новой генетической информации в *E. coli* определите суть этого пути, если происходит: трансформация, трансдукция, конъюгация, то это соответственно:

• передача генетической информации через пили при сближении двух клеток;

• непосредственное включение в клетку ДНК;

• внесение с помощью рекомбинантов ДНК фага новой генетической информации;

• введение в клетку реципиента фрагмента ДНК из генома без помощи вектора.

12. Укажите, какие клетки иммобилизуются легче всего в промышленном технологическом процессе:

- клетки животного происхождения;
- клетки растительного происхождения;
- клетки микроорганизмов;
- происхождение клеток не имеет значения.

Приведите схему использования иммобилизованных ферментов.

13. Какая система транспорта питательных веществ через мембраны обеспечивает возможность развития микроорганизма в условиях низкого содержания питательных веществ?

- Пассивная диффузия.
- Активный транспорт.
- Облегченная диффузия.
- Пассивный транспорт.

В каких случаях переносимый субстрат движется через мембраны клетки микроорганизма по градиенту концентрации?

14. Укажите, какие правила GMP определяют гарантии качества для стран-импортеров:

- национальные;
- региональные;
- правила ВОЗ;
- правила Государственной фармакопеи. Ответ обоснуйте.

15. Напишите, в каких случаях требуется проведение валидации в биотехнологическом производстве ЛС.

Вариант 6

1. Какие типы ферментации в одной из классификаций биосинтеза вы можете выбрать, если в основе ее лежит характер культивирования продуцента?

- Поверхностная.
- Глубинная.
- Периодическая.
- Полупериодическая.
- Многоциклическая.

Напишите, какой из типов ферментаций относят к регулируемому.

2. Стерилизацию фильтров для получения «технологического воздуха» проводят с помощью:

- тепловой обработки;
- ионизирующего облучения;
- обработки антисептиками;
- обработки антибиотиками.

Приведите схему стерилизации технологического воздуха.

3. Приведите схему структуры биотехнологического производства. Определите, что входит в подготовительные и основные его стадии.

4. Какой процесс ферментации следует считать наиболее целесообразным, если конечным продуктом является непосредственно сама биомасса выращиваемого микроорганизма?

- Периодический.
- Полупериодический.
- Непрерывный.
- Отъемно-доливной.

Приведите пример получения БАВ при таком процессе.

5. Какие биообъекты требуют особенно тщательного контроля по предупреждению попадания во внешнюю среду?

- Микроорганизмы.
- Микроорганизмы-рекомбинанты.
- Каллусные клетки.
- Животные клетки.

Какие методы профилактики попадания микроорганизмов во внешнюю среду вы знаете?

6. Укажите отличия клеточной инженерии от традиционной генетики:

- отбор;
- селекция;
- скрещивание;
- слияние протопластов.

Опишите условия стабилизации протопластов. Приведите схему получения протопластов.

7. Укажите реципиент, который чаще всего используют в генной инженерии:

- дрожжи;
- сенную палочку;
- кишечную палочку;
- не имеет значения.

Определите суть генной инженерии и ее этапы в процессе создания рекомбинантных белков.

8. Укажите, что может содержать культуральная жидкость помимо целевого продукта:

- продуцент;
- аллергены;
- пирогены;
- низкомолекулярные продукты лизиса клеток.

Какие методы выделения целевого продукта можно предложить в случае локализации его в культуральной жидкости? От каких свойств выделяемого продукта зависит выбор метода?

9. Перечислите цели, которые ставит биотехнолог при совершенствовании биообъекта-продуцента.

10. Радиационная (лучевая) стерилизация не может бть применена в случае стерилизации:

- β-лактамов;
- тетрациклинов;
- аминогликозидов;
- полиенов.

Напишите, как влияет радиационная стерилизация на внешний вид ЛС и на его активность.

11. Функциональная (метаболическая) геномика изучает:

- количественную характеристику генов в геноме;
- степень гомологии родственных генов;

• связи между кластерами генов и их метаболизмом;

• связи между отдельными генами и их метаболизмом. Определите связь геномики и протеомики в свете использования

их при создании новых ЛС.

12. Индукция фермента - это:

• абсолютное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление индуктора;

• относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление индуктора;

абсолютное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на исчезновение индуктора;

• относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на исчезновение индуктора.

Приведите схему генетической регуляции индукции и репрессии ферментов.

13. Укажите, что предусматривают правила GCP:

• лабораторные испытания;

• аналитические испытания;

• клинические испытания;

• предклинические испытания. Приведите расшифровку понятия «GCP».

14. Соедините процесс синтеза РНК со стадиями. Процесс:

• связывание РНК-полимеразы с ДНК;

• начало синтеза;

• рост цепи РНК;

• терминация. Стадии:

• освобождение продукта и фермента из комплекса с матрицей;

• активация матрицы;

• дезактивация матрицы;

• элонгация - синтез цепи РНК;

• инициация образования первой межнуклеотидной связи.

15. Под контролем гуанозинтетрафосфата находится синтез важнейших компонентов клеточной мембраны и клеточной стенки, которыми являются:

- фосфолипиды;
- липополисахариды;
- пептидогликан;
- все вышеперечисленное.

Напишите название и суть механизма, координирующего процессы синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Контрольная работа ? 2

Темы

Биотехнология ЛС на основе культур клеток растений. Биотехнология стероидных препаратов, антибиотиков, аминокислот, ферментов, витаминов. Иммунобиотехнология. Рекомбинантные белки. Нормофлоры.

Вариант 1

1. Из нижепредставленных антибиотиков укажите представителей только β-лактамных антибиотиков:

- пенициллин;
- циклоспорин;
- цефалоспорин^{p};
- фузидовая кислота.

Напишите определение антибиотиков в современных представлениях и приведите механизм биосинтеза антибиотиков-β-лактамов.

2. Укажите преимущества каждого из перечисленных ниже антибиотиков:

ванкомицина;

- телитромицина;
- азитромицина;
- эритромицина. Преимущества:
- невысокая цена;
- подавление роста эритромицинорезистентных штаммов;
- отсутствие приобретения резистентности;

• высокая степень проникновения во внутриклеточные паразиты. Напишите названия цефалоспоринов четвертого поколения, устойчивых к β-лактамазам грамотрицательных и грамположительных бактерий.

3. Укажите антибиотики, образованные актиномицетами и подавляющие рост грибов и дрожжей, в том числе патогенных:

• рифампицин;

• нистатин;

• эритромицин;

• амфотерицин В.

Каковы особенности структуры этих антибиотиков и их класс?

4. Укажите сходство между синтезом жирных кислот (первичных метаболитов) и антибиотиков (вторичных метаболитов):

• сборка структуры из остатков ацетатных и пропионатных единиц по принципу «голова к хвосту»;

• формирование связи между углеродом карбоксильной группы и углеродом метильной (метиленовой) группы;

• обязательное участие в ферментных реакциях кофермента А;

• необязательное участие в ферментных реакциях кофермента А. Напишите, в чем заключается принципиальное различие в синтезе жирных кислот и антибиотиков?

5. Во время ферментационного процесса имеется две фазы развития культуры продуцента. Укажите, что означает каждая из этих фаз.

Фазы:

• трофофаза;

• идиофаза. Значение:

• фаза сбалансированного роста;

• фаза несбалансированного роста;

• антибиотик почти не обнаруживается;

• прирост биомассы замедлен;

• фаза быстрого накопления антибиотика.

Нарисуйте и опишите схему общих закономерностей ферментационного процесса биосинтеза антибиотиков. Обоснуйте причину появления антибиотика в идиофазе.

6. Выберите из нижеприведенного общую причину неблагоприятного влияния высокого содержания в среде фосфатов на биосинтез антибиотика:

- биологическая роль антибиотиков становится ненужной;
- антибиотики не выделяются из клетки в среду;
- антибиотики инактивируются;
- антибиотик подавляет рост своего продуцента.

7. Укажите, для какого из нижепредставленных антибиотиков разработан полупериодический метод ферментации как оптимальный:

- пенициллина;
- эритромицина;
- тетрациклина;
- неомицина.

Напишите, какие особые требования предъявляют по отношению к производству этого антибиотика согласно правилам GMP.

8. Какие антибиотики из нижепредставленных являются ДНК-тропными?

- Антрациклин^{p}.
- Блеомицин.
- Рифампицин.
- Макролиды.

Напишите, почему антибиотики этих групп не применяют в инфекционных клиниках?

9. Укажите, когда плазмидная резистентность к антибиотикам встречается редко, и в каком случае наблюдают это явление:

- при уменьшении проницаемости оболочки микробной клетки;
- при активном выбросе антибиотика;
- при ферментативной инактивации;
- при изменении конформации внутриклеточной мишени.

10. Укажите, каким образом осуществляется транспорт антибиотика через внешнюю мембрану бактерий:

- через пориновые каналы;

• через специфическую систему транспорта, сходную с таковой для антибиотика метаболита;

• через липидные участки мембраны;

• путем активного транспорта.

Напишите, что определяет скорость проникновения антибиотика через пориновые каналы.

11. Укажите, какой эффект может происходить при воздействии на разные виды пенициллинсвязывающих белков.

• Метаболический.

• Литический.

• Бактерицидный без лизиса.

• Бактериостатический разной длительности.

Напишите, каким больным предпочтительнее назначать β-лактамы, реагирующие с ПБС-2, с ПБС-3.

12. При суспензионном культивировании растительных клеток имеет значение:

• форма сосуда;

• аэрация;

• перемешивание;

• скорость вращения сосуда.

13. Дикорастущий женьшень может быть использован как сырье для извлечения панаксозидов. Укажите оптимальный вариант получения панаксозидов, имея в виду:

• сбор дикорастущих лекарственных растений;

• выращивание на плантациях;

• выращивание культур тканей высших растений в виде каллуса;

• культивирование химерных клеток, в геном которых встроены опероны, ответственные за биосинтез лекарственной субстанции.

Укажите конкретные преимущества этого метода.

14. Регуляторы роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма растительных клеток - ауксины и цитокинины. Соедините их с соответствующими химическими соединениями, представленными ниже:

• индолилтриуксусной кислотой;

- нафтилуксусной кислотой;
- 2, 4-дихлорфенилуксусной кислотой;
- 6-бензиламинопурином;
- N-изопентеном;
- 6-фурфуриламинопурином (кинетином);
- аминопурином.

15. Среди ферментов биотехнологического производства в числе первых белков, полученных в высокоочищенном кристаллическом

состоянии, были протеазы. К настоящему времени известно 4 класса протеаз. Укажите, на чем основана современная классификация протеаз.

- На определенном сочетании любых аминокислотных остатков.
- На уникальном сочетании определенных аминокислотных остатков.
- На специфическом строении активных центров ферментов.
- Специфическое строение активных центров ферментов не имеет значения.

Приведите названия 4 классов протеаз и ответьте, когда происходит формирование активного центра фермента.

16. Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают ферменты, среди которых липолитический фермент:

- солизим;
- α-амилаза;
- стрептокиназа;
- галактаза.

Укажите сферу применения данного фермента и его функцию в организме.

17. Напишите, какое свойство имеют тиолзависимые протеиназы, и как оно может быть использовано для разделения рацемических смесей, если они участвуют не только в реакциях гидролиза, но и синтеза.

18. Выберите из нижеперечисленного, какие способы получения аминокислот имеют наибольшее распространение:

- химический;
- химико-энзиматический;

- гидролиз белоксодержащих субстратов;
- микробиологический синтез из простых соединений. Ответ обоснуйте.

19. У коринебактерий регуляция биосинтеза лизина осуществляется на уровне управления активностью ферментов. Аспарагиновая кислота выступает либо как предшественник лизина, либо трансформируется в предшественник лизина. Укажите, в каком случае ингибируется предшественник лизина:

- если в клетке имеется повышенная концентрация только лизина;
- если в клетке имеется повышенная концентрация только треонина;
- если в клетке имеется повышенная концентрация лизина и треонина одновременно;
- если в клетке имеется повышенное содержание гомосерина.

20. Укажите, в каких случаях применяют сыворотки:

- для профилактики;
- для лечения;
- для диагностики;
- при отравлении ядами микробов или животных;
- при пищевом отравлении.

Напишите, что лежит в основе промышленного получения сывороток.

Как называется иммунитет, развивающийся при введении сывороток, и что в этом случае получает организм человека?

Вариант 2

1. Из представленных ниже антибиотиков укажите только представителя антибиотиков стероидной структуры:

- пенициллин;
- цефалоспорин^{p};
- фузидовая кислота;
- циклоспорин.

Приведите характеристику антибиотиков стероидной структуры и укажите их особенности.

2. Подберите к каждому названию геномики его функциональную нагрузку.

Геномика:

- структурная;
- сравнительная;
- функциональная. Функции:
- данные о путях модификации гена;
- последовательность нуклеотидов;
- степень сходства в последовательности нуклеотидов;
- функции гена.

Напишите, какое практическое значение имеет геномика при скрининге ЛС.

3. Укажите, что сближает актиномицеты и бактерии как продуценты антибиотиков:

- геном не заключен в ядро;
- геном представляет собой кольцевую хромосому;
- кольцевая хромосома не отделена от цитоплазмы;
- клеточная стенка состоит из пептидогликана.

Напишите, когда наблюдают максимальное накопление антибиотиков, образуемых грибами или актиномицетами в культуральной жидкости.

4. Укажите, для биосинтеза каких антибиотиков предшественниками являются аминокислоты:

- эритромицина;
- тетрациклина;
- аминогликозидов;
- β-лактамов.

Приведите примеры ингибиторов синтеза пептидогликана бактериальной клетки.

5. Укажите, с чем прежде всего связан рост активности продуцента антибиотика в биотехнологическом производстве.

- Подбором подходящего штамма.
- Обработкой мутагенами.
- Изменением температуры процесса.

• Продолжительностью ферментации.

Приведите пример повышения продуктивности продуцента пенициллина с момента его обнаружения. Напишите, что является мишенью для физических, химических мутагенов в клетке биообъекта.

6. Укажите, что осуществляет азоткатаболитная регуляция биосинтеза антибиотиков:

• ослабляет рост продуцентов;

• усиливает рост продуцентов;

отрицательно влияет на биосинтез антибиотиков;

• положительно влияет на биосинтез антибиотиков.

Ответ обоснуйте. Приведите пример катаболитной репрессии.

7. Укажите, как осуществляется иммобилизация мицелия продуцентов антибиотиков:

• в жидкой среде;

• в твердой фазе;

• в суспензиях;

• в гелях.

Приведите пример такой иммобилизации и укажите преимущества и недостатки использования этого метода.

8. Известны следующие механизмы антибиотикорезистентности:

• изменяется конформация внутриклеточной мишени антибиотика;

• в оболочке клетки появляются системы «активного выброса» антибиотика;

• происходит ферментативная инактивация антибиотика защитными ферментами.

Подберите антибиотики, по отношению к которым известен каждый из указанных механизмов.

9. Перечислите пути преодоления полирезистентности микроорганизмов:

• использование ингибиторов, инактивирующих ферменты;

• использование новых антибиотических структур;

• комбинированная химиотерапия;

• использование иммуномодуляторов.

10. Укажите, когда уровень антибиотикорезистентности особенно высок:

- при уменьшении количества пориновых каналов;
- при сужении диаметра пориновых каналов;
- при ферментативной инактивации;
- при увеличении количества пориновых каналов;
- при изменении конформации мишени.

Напишите, какие свойства антибиотика позволяют ему быстро проникать через пориновые каналы.

11. Каковы причины добавления ФУК в культуральную среду в процессе производства пенициллина?

- Для накопления биомассы.
- Для начала активного синтеза.
- Для ускорения процесса.
- Для осуществления направленного синтеза бензилпенициллина.

Напишите, когда надо добавлять ФУК в процессе производства пенициллина при ферментации. Укажите, что используют в качестве источника энергии в этом случае.

12. Укажите, что из нижеперечисленного относится к понятию «рекомбинантные белки» при получении их путем микробиологического синтеза:

- инсулин человека;
- интерфероны человека;
- гормон роста;
- эритропоэтин;
- пенициллиназа.

Опишите, какими путями можно защитить рекомбинантный белок от протеолиза, т.е. от действия протеаз продуцента.

13. Укажите, в какой ситуации возникает каталитическая реакция фермента. Она возникает, когда:

- пространственная конфигурация субстрата и активного центра соответствуют друг другу;
- пространственная конфигурация субстрата и активного центра не соответствуют друг другу;

- ферментно-субстратный комплекс подвергается ферментному катализу;
- ферментно-субстратный комплекс подвергается гидролизу.

14. Белки состоят из L-аминокислот. Существуют ли биологические полимеры, в которых кроме L-аминокислот содержатся D-аминокислоты? Приведите примеры. Укажите биологическую роль D-аминокислот в таких белках. Может ли это явление быть использовано в фармации? Приведите примеры.

15. Большинство продуцентов лизина не способны синтезировать гомосерин или треонин, т.е. являются «ауксотрофами» по этим аминокислотам. Что надо сделать, чтобы вызвать сверхсинтез лизина?

- Нарушить синтез треонина.
- Не нарушать синтез треонина.
- Нарушить синтез гомосерина.
- Не нарушать синтез гомосерина.

Напишите, какие вещества нужно добавить в питательную среду, чтобы синтез лизина не происходил, а происходил бы рост биомассы для значительного выхода целевого продукта, т.е. лизина.

16. Укажите вторичные метаболиты как источники вакцин, получаемых из антигенов:

- живые или ослабленные микроорганизмы;
- неживые, убитые микробные клетки или вирусы;

антигенные структуры из микроорганизмов;

- токсины из микроорганизмов.

Напишите, как разделяют способы усиления иммунного ответа, имея в виду тип воздействия и используемые средства.

17. Допишите, что обеспечивает каждый компонент в составе вакцин:

- действующий компонент;
- консервант;
- стабилизатор;
- полимерный носитель.

Приведите определение иммуногенности.

18. Напишите, какие препараты относят к препаратам нормофлоров. Приведите краткую характеристику. Укажите, какие микроорганизмы образуют нормальную (резидентную) микрофлору желудочнокишечного тракта. Приведите синонимы нормофлоров.

19. Укажите, что из нижеприведенного необходимо использовать для развития биотрансформации как эффективного направления в создании лекарственных препаратов:

- селекцию специальных линий клеток;
- оптимизацию условий культивирования;
- сокращение времени ферментации;
- увеличение времени ферментации;
- увеличение срока работы клеток.

Опишите применение биотрансформации в процессе получения дигоксина при использовании растения*Digitalis Lanata.*

20. Укажите, как осуществляют мониторинг инсулина (содержание в крови пациента) в клинике:

- методом ВЭЖХ;
- методом электрофореза;
- методом биологических испытаний;
- методом радиоиммунного и иммуноферментного анализа. Напишите, как контролируют концентрацию инсулина в крови

человека.

Вариант 3

1. Из представленных ниже антибиотиков укажите антибиотик с иммунодепрессантными свойствами:

- пенициллин;
- цефалоспорин^{p};
- фузидовая кислота;
- циклоспорин.

Укажите источники антибиотиков с иммунодепрессантными свойствами и приведите примеры их продуцентов.

2. Укажите причину образования разных антибиотиков различными штаммами одного вида:

так как гены биосинтеза антибиотиков локализованы в хромосомах;

- так как гены биосинтеза антибиотиков локализованы только в плазмидах;
- так как часть генов находится в «молчащем» состоянии (они не экспрессируются);
- так как гены могут передаваться от одного микроорганизма к другому путем конъюгации.

Приведите примеры.

3. В процессе биосинтеза антибиотика эритромицина образуется макроциклическое лактонное кольцо, являющееся результатом:

- ферментативной полимеризации 1 единицы пропионата и 6 единиц метилмалоната;
- ферментативной полимеризации 6 единиц пропионата и 1 единицы метилмалоната;
- ферментативных превращений с участием глюкозы;
- ферментативных превращений с участием крахмала.

4. Напишите, что такое «углерод-катаболитная регуляция биосинтеза антибиотиков» и в чем заключается ее роль:

- в резком снижении биосинтеза;
- в резком повышении биосинтеза;
- в резком уменьшении образования биомассы.

5. Опишите механизм внутриклеточной регуляции на примере первичного метаболита, прямого предшественника β-лактамных антибиотиков валина, используя понятия «трипептид», «валин» (его избыток), «принцип обратной связи», «результат процесса».

6. Укажите, в чем заключается опасность применения β-лактамных антибиотиков для человека:

- эмбриотоксичности;
- аллергенности;
- пирогенности;
- мутагенности.

Напишите, какую особенность производства β-лактамных антибиотиков учитывают при соблюдении правил GMP.

7. Укажите, связана ли токсичность антибиотика с механизмом его действия, если он ингибирует:

- образование клеточной стенки бактерий;
- белковый синтез;
- синтез нуклеиновых кислот;

функции цитоплазматической мембраны микробной клетки.

8. Укажите, что из нижеприведенного имеет значение для проникновения антибиотика в клетку через пориновые каналы:

- размеры молекул антибиотика;
- pH среды;
- диаметр водных каналов;
- свойства белков-поринов.

Объясните различия в терапевтическом эффекте бензилпенициллина при лечении кишечных инфекций и гонореи.

9. Укажите основных представителей класса карбоксильных (кислых) протеаз из нижеприведенных ферментов:

- пепсин;
- кислые протеазы из грибов;
- химозин;
- трипсин.

Напишите название соединения, являющегося специфическим ингибитором протеаз данного класса. Приведите общие признаки протеаз.

Укажите порядок получения иммобилизованной аминоацилазы в виде схемы, используя понятия «продуцент фермента», «культуральная жидкость», «иммобилизация», «биокатализатор».

10. Укажите ферменты, получаемые из животного сырья и относящиеся к щелочным протеазам:

- пепсин;
- трипсин;
- химотрипсин;
- субтилизины.

Напишите, что обеспечивает безопасность применения щелочных протеаз.

11. Микробиологический синтез аминокислот предусматривает наличие продуцентов, питательных сред, очистку, упаривание, перекристаллизацию. Приведите:

- примеры микроорганизмов-продуцентов для синтеза аминокислот;
- источники углерода и азота, необходимые для питательных сред;
- способы очистки препаратов аминокислот от примесей.

12. Укажите, каким путем интенсифицируют биосинтез цепей А и В инсулина по схеме «Eli Lilly». Каковы причины использования генной инженерии при создании видоспецифичных рекомбинантных белков? Перечислите видоспецифические белки и напишите, какие возможны побочные реакции у бычьего и свиного инсулина при их введении в организм, особенно у детей.

13. Подберите способ получения вакцин, если это:

- живые бактерийные вакцины;
- живые вирусные вакцины;
- молекулярные вакцины;
- корпускулярные вакцины. Сопоставьте со способом:
- получают из микробных клеток, которые инактивируют температурой, УФ-облучением, химическими веществами (спирт, фенол);
- специфический антиген или экзотоксины выделяют из микробной массы, очищают и концентрируют; токсины обезвреживают и получают анатоксины; специфический антиген может быть получен и путем химического или биохимического синтеза;
- получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе или в культурах животных клеток;
- получают наиболее просто - в ферментере, выращивая чистые ослабленные культуры.

Приведите примеры неживых вакцин, вакцин для профилактики вирусных инфекций, анатоксинов.

14. Укажите проблемы, возникающие при выращивании животных клеток для производства сывороток:

- генетическая нестабильность;
- постоянство генетической экспрессии;
- непостоянство генетической экспрессии;
- старение.

15. Синтез целевой аминокислоты может прекращаться из-за образования самим продуцентом токсичных метаболитов, например фенилаланина. Укажите:

• название продуцента этой аминокислоты;

• токсичные метаболиты, прекращающие выход целевого продукта;

• меры предупреждения накопления этих примесей, если иметь в виду влияние углерода на биосинтез фенилаланина.

16. Напишите определение гнотобиологии и ее значение для биотехнологии при создании ЛС.

17. Перечислите препараты нормофлоров и приведите их характеристику. Укажите, каковы механизмы действия нормофлоров на гнилостную микрофлору кишечника. Приведите синонимы нормофлоров.

18. Укажите, какой метод лежит в основе промышленного получения пантотеновой кислоты:

химический синтез;

• органический синтез;

• тонкий химический синтез;

• микробиологический синтез. Обоснуйте ответ.

19. В процессе получения витамина B_{12} одним из этапов биотехнологического производства является выращивание пропионовых бактерий. Укажите, что из нижеприведенного используют в этом случае:

• непрерывный метод ферментации;

• периодический метод ферментации;

• процесс идет в анаэробных условиях;

• процесс идет в условиях аэрации;

• добавление кукурузного экстракта к питательной среде. Напишите:

• что образуется в процессе ферментации;

• что непрерывно подают в ферментер;

• почему необходимо обязательно добавлять предшественник витамина B_{12}.

В какое время после начала ферментации в среду добавляют предшественник?

20. Для сохранения активности штамма-продуцента рибофлавина необходимо регулярно проводить его рассев на твердые питательные среды, отбирая колонии, наиболее

интенсивно окрашенные в цвет, с которым коррелирует активность штамма. Выберите из представленных вариантов этот цвет:

- желтый;
- оранжевый;
- розовый;
- красный.

Напишите, какие недостатки имеет культура дрожжеподобных грибов, используемая в промышленном получении рибофлавина.

Вариант 4

1. Укажите составляющие современного понятия «антибиотик»:

- источник получения;
- метод получения;
- терапевтическое воздействие;
- социальное значение;
- токсичность.

Приведите современное определение антибиотиков. Укажите генетические основы биосинтеза антибиотиков.

2. Приведите первичные метаболиты, используемые при синтезе (сборке) молекулы антибиотика, если это:

- пенициллин;
- аминогликозиды;
- тетрациклины;
- макролиды. Первичные метаболиты:
- глюкоза;
- аминокислоты;
- ацетатные и пропионатные единицы.

Напишите, в чем заключается суть сборки молекулы антибиотика.

3. Укажите, что необходимо учитывать при разработке технологии биосинтеза антибиотиков:

• антибиотики - вторичные метаболиты;

• они синтезируются из первичных метаболитов;

• это промежуточный этап цепи ферментативных реакций;

• это конечный этап цепи ферментативных реакций. Какова биологическая роль антибиотиков?

4. Укажите, что обозначает термин «катаболитная репрессия»:

• подавление синтеза определенных ферментов продуктами катаболизма глюкозы и других легкоокисляемых соединений;

• подавление использования источников углерода продуктами катаболизма глюкозы;

• подавление использования источников азота продуктами катаболизма глюкозы.

Опишите влияние этого явления на биосинтез вторичных метаболитов.

5. Укажите, что из нижеприведенного относится к мощным репрессорам биосинтеза антибиотиков:

• крахмал;

• глюкоза;

• лактоза;

• сахароза.

В чем заключается механизм репрессии биосинтеза антибиотиков?

6. Укажите свойства высокоактивных штаммов-продуцентов антибиотиков, получаемых генетическими методами:

• при их применении не происходит нарушения механизмов обратной связи биосинтеза;

• происходит нарушение механизмов обратной связи биосинтеза;

• присутствует чувствительность к собственному антибиотику;

• отсутствует чувствительность к собственному антибиотику. Ответ обоснуйте.

7. Укажите, что не является ингибитором белкового синтеза:

• пенициллин;

• левомицетин;

• эритромицин;

• тетрациклин.

Приведите примеры ингибиторов β-лактамаз и примеры комбинированных ЛС, включающих ингибиторы β-лактамаз.

8. Укажите, в какой части бактериальной клетки воспроизводятся защитные механизмы, которые обусловливают антибиотикорезистентность:

- во внешней мембране;
- в периплазматическом пространстве;
- в цитоплазме;
- в капсуле.

Опишите механизм резистентности к тетрациклинам.

9. Укажите, что имеет значение для проникновения антибиотика в клетку:

- размеры молекул антибиотика;
- состояние среды;
- диаметр водных пориновых каналов;
- свойства белков-поринов.

Напишите, при какой степени гидрофобности проникновение антибиотика в клетку замедляется, имея в виду, что она может быть высокая, низкая, либо степень гидрофобности не имеет значения.

10. Выберите направления исследований, имеющих целью защиту антибиотиков от ферментативной инактивации:

- химическая модификация молекулы антибиотика;
- биологическая трансформация молекулы антибиотика;
- комбинированная химиотерапия;
- инкапсулирование в липосомы;
- увеличение дозы антибиотика.

11. Укажите, от чего зависит защитная функция ингибитора β-лактамаз:

- от спектра действия;
- от реагирования с мишенью антибиотика;
- от фармакокинетического сходства с антибиотиком;
- от фармакокинетического отличия от антибиотика.

12. Укажите, какие свойства присущи нижеуказанным лекарственным препаратам:

• имипинем (карбопинем^{p});

• азтреонам (монобактам^{p}). Свойства:

• большая скорость прохождения по пориновым каналам;

• устойчивость к ряду β-лактамаз;

• простота структуры;

• сложность структуры.

13. Природные микроорганизмы обладают механизмами регуляции биосинтеза по принципу обратной связи (ретроингибирование):

• на первом уровне сама аминокислота, в случае ее избытка, ингибирует один из ферментов собственного синтеза;

на втором уровне подавляется весь комплекс ферментов, если концентрация аминокислоты остается в избытке.

Укажите, какой из механизмов должен быть нарушен при создании микроорганизмов-продуцентов аминокислот с целью увеличения выхода целевого продукта:

• только на первом уровне;

• только на втором уровне;

• на обоих уровнях. Приведите пример.

14. Основываясь на особенностях регуляции биосинтеза треонина у кишечной палочки, его выход увеличили путем:

• изменения первого фермента биосинтеза, сделав его нечувствительным к треонину;

• снижения активности фермента, синтезирующего из треонина изолейцин (вызвали «хроническое голодание» по изолейцину, убрали механизм репрессии, хотя избыток треонина остался);

• использования метода генной инженерии (выделили гены синтеза треонина и размножили их на плазмидах).

Напишите, каковы отличия продуцента треонина от продуцента лизина, имея в виду использование аминокислот для роста биомассы.

15. Объясните, каково значение гена β-галактозидазы при получении инсулина по схеме «Eli Lilly». Каков принцип мониторинга инсулина (повременное определение его содержания в крови пациента) в клинике?

17. Класс нейтральных или металлопротеиназ - это группа ферментов в основном микробного происхождения, содержащая в активном центре ионы металлов, перестающих функционировать в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты. Укажите эти металлы из нижеприведенных:

- натрий;
- калий;
- кальций;
- цинк.

Напишите, что именно гидролизуют нейтральные протеиназы. При каких значениях pH они эффективны. Напишите, какие ферменты этой группы используют в медицине в качестве ЛС.

18. Укажите наиболее рентабельный путь получения кристаллического β-каротина:

выращиванием продуцента;

- с использованием биотрансформации;
- с использованием генно-инженерных штаммов;
- химическим синтезом. Обоснуйте выбор.

19. Укажите, в каком случае применение убихинона-10 наиболее целесообразно:

- в профилактических целях;
- в диагностических целях;
- в лечебных целях;
- цель применения не имеет большого значения.

Какую роль играет убихинон в организме человека и какой наиболее предпочтительный источник получения убихинонов вы знаете?

20. В случае если растворимость стероидного соединения слишком мала для проявления присущей микроорганизму ферментативной активности, необходимо использовать методики, повышающие эту растворимость. Укажите, какая методика является оптимальной:

- добавление органических растворителей;
- получение водорастворимых форм стероидов в виде более растворимых солей;
- трансформирование в 2-фазной системе вода-растворитель;
- заключение стероида в растворимый комплекс с циклодекстрином.

Обоснуйте свой выбор. Вариант 5

1. Укажите, что отличает антибиотики от антисептиков:

- активность;
- избирательность;
- использование;
- получаемый результат.

Перечислите продуценты антибиотиков из почвенных микроорганизмов (род и вид). Приведите краткую общую характеристику продуцентов и требования к ним.

2. Найдите отличия антибиотиков тетрациклиновой структуры от антибиотиков антрациклиновой структуры:

- механизм действия;
- наличие аминосахара;
- спектр антибиотического действия;
- применение в клинической практике;
- количество сконденсированных бензольных колец в химической формуле.

3. Особое значение в биотехнологии имеют суперпродуценты, жизнедеятельность которых сохраняется в силу того, что:

максимальная концентрация антибиотика сохраняется при завершении роста культуры;

- антибиотик синтезируется в тех местах клетки, которые отделены от мест локализации жизненно важных метаболических процессов;
- транспорт антибиотика через оболочку имеет одностороннее направление;
- транспорт антибиотика через оболочку имеет двустороннее направление.

4. Укажите, какие группы антибиотиков являются ингибиторами:

- образования клеточной стенки бактерий;
- белкового синтеза у бактерий;
- синтеза нуклеиновых кислот;
- функций цитоплазматической мембраны микробной клетки;
- протеаз.

Сопоставить с антибиотиками:

- пенициллины, цефалоспорины;
- стрептомицин, гентамицин;
- антрациклин, блеомицин;
- амфотерицин В, нистатин.

5. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане заключается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации. Укажите конкретно, каким образом это происходит:

- без деления клетки, и при этом они реплицируются;
- с делением клетки, и при этом они реплицируются;
- без деления клетки, и при этом репликации не происходит. Напишите, в каком случае встречается плазмидная резистентность.

Приведите понятие госпитальных (внутрибольничных) инфекций.

6. Транспорт антибиотика через внешнюю мембрану бактериальных клеток может быть осуществлен через:

- специфическую систему транспорта, сходного с таковым для метаболита антибиотика;
- пориновые каналы;
- с использованием липофильных свойств веществ;
- с использованием асимметрии внешней мембраны.

Опишите свойства поринов и пориновых каналов. Укажите их значение для выхода антибиотика во внешнюю среду и связь с антибиотикорезистентностью.

7. Укажите предшественников β-лактамных антибиотиков в качестве первичных метаболитов:

цистеин;

- валин;
- аминоадипиновая кислота;
- глутаминовая кислота;
- аденин.

Напишите названия продуцентов пенициллина и цефалоспорина[р].

Представьте схему механизма действия β-лактамных антибиотиков.

8. Укажите представителей противогрибковых (полиеновых) антибиотиков:

- нистатин;
- леворин;
- амфотерицин В;
- брунеомицин*.

Опишите механизм действия полиенов на грибы, учитывая стерольный компонент мембраны грибов. Распространяется ли это действие на бактерии?

9. Создание препаратов-ингибиторов β-лактамаз предполагает комбинацию антибиотиков и ингибиторов β-лактамаз. Напишите, какие препараты можно представить в качестве примеров для преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Укажите, каким сходным свойством *in vivo* должны обладать антибиотики и ингибиторы защитных ферментов.

10. Укажите антибиотики, легко проникающие в клетку патогена:

- β-лактамы;
- аминогликозиды;
- макролиды;
- гликопептиды.

Опишите механизм действия аминогликозидов.

11. Укажите, чем обусловлено практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина:

- активностью против анаэробных патогенов;
- отсутствием нефротоксичности;
- устойчивостью к защитным ферментам бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды;
- активностью против патогенных грибов. Опишите принцип его создания.

12. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика заключается в:

- низком сродстве рибосом;
- активном выбросе антибиотиков;
- временной ферментативной инактивации.

13. Пенициллинацилазу используют при:

- проверке заводских серий пенициллина на стерильность;
- оценке эффективности пенициллиновых структур;
- получении полусинтетических пенициллинов;

снятии аллергических реакций на пенициллин. Подтвердите ответ примером.

14. Природные микроорганизмы обладают механизмами регуляции биосинтеза по принципу обратной связи (ретроингибирование):

- на первом уровне сама аминокислота в случае ее избытка ингибирует один из ферментов собственного синтеза;
- на втором уровне подавляется весь комплекс ферментов, если концентрация аминокислоты остается в избытке.

Укажите, какой из этих механизмов должен быть нарушен при создании микроорганизмов-продуцентов с целью увеличения выхода целевого продукта:

- только на первом уровне;
- только на втором уровне;
- на обоих уровнях;
- не имеет значения.

15. У коринебактерий регуляция биосинтеза лизина осуществляется на уровне управления активностью ферментов. Аспарагиновая кислота выступает либо как предшественник лизина, либо трансформируется в предшественник лизина. Укажите, в каком случае ингибируется предшественник лизина:

- если в клетке имеется повышенная концентрация только лизина;
- если в клетке имеется повышенная концентрация только треонина;
- если в клетке имеется повышенная концентрация лизина и треонина одновременно;
- если в клетке имеется повышенное содержание гомосерина. Ответ обоснуйте.

16. Большинство продуцентов лизина не способно синтезировать гомосерин или треонин, т.е. является ауксотрофами по этим аминокислотам. Что необходимо изменить, чтобы вызвать сверхсинтез лизина?

- Нарушить синтез треонина.
- Не нарушать синтез треонина.
- Нарушить синтез гомосерина.
- Не нарушать синтез гомосерина.

Напишите, какие компоненты нужно добавить в питательную среду в целях значительного выхода целевого продукта лизина, чтобы происходил не синтез лизина, а рост биомассы?

17. Укажите причины использования методов генной инженерии при создании инсулина:

ограниченность сырьевой базы;

- необходимость пролонгации эффекта;
- трудности с транспортировкой сырья;
- наличие осложнений аллергического характера;
- удешевление продукта.

Чем отличается бычий инсулин от человеческого?

18. Укажите, в каких случаях нецелесообразно применять сыворотки:

- для профилактики;
- для лечения;
- при отравлении ядами микробов или животных;
- при пищевых отравлениях;
- при диагностике заболеваний. Напишите:
- что лежит в основе профилактического и лечебного действия сывороток;
- что лежит в основе массового получения сывороток;
- как называется получаемый иммунитет.

19. В иммунобиотехнологии консервирование является средством сохранения посевного материала (молодых клеток), но в процессе замораживания могут происходить нежелательные процессы:

- образование кристаллического льда в клетке;
- обезвоживание;
- повышение концентрации растворенных веществ;
- понижение концентрации растворенных веществ;
- накопление примесей.

Укажите из вышепредставленных процессов только те, которые могут происходить в этом случае. Напишите, от чего зависит возникновение этих процессов и что необходимо

вносить дополнительно при замораживании в этом случае. Укажите оптимальные объемы емкостей для замораживания.

20. Опишите механизмы антагонистической активности молочнокислых бактерий. Приведите примеры препаратов нормофлоров.

Вариант 6

1. Из нижепредставленных антибиотиков укажите те, которые образуются актиномицетами:

• пенициллин;

• стрептомицин;

• гентамицин; •канамицин.

Приведите примеры образования различными штаммами одного вида разных антибиотиков на примере*Streptomyces griseus.*

2. Укажите, какие особенности биосинтеза имеют антибиотики:

• они не относятся к прямым продуктам трансляции или вообще матричного синтеза;

• они образуются из первичных метаболитов;

• биосинтез любого антибиотика происходит в мультиферментном комплексе;

• биосинтез любого антибиотика происходит с участием ферментов. Укажите 3 механизма защиты суперпродуцентов от вырабатываемого антибиотика.

3. Укажите представителей групп антибиотиков, которые входят в число ингибиторов пептидогликана клеточной стенки бактерий:

• аминогликозиды;

• β-лактамы;

• гликопептиды;

• циклопептиды.

Приведите схему строения пептидогликана.

4. Укажите антибиотики, образуемые споровыми бактериями:

• полимиксин В;

• амфотерицин В;

• дауномицин^{р};

- грамицидин С.

Охарактеризуйте продуценты и структуру этих антибиотиков.

5. Укажите, от чего зависит потребность биомассы в кислороде при биосинтезе антибиотика:

- от температуры;
- от концентрации биомассы;
- от дыхательной активности;
- от кислотности среды;
- от вязкости культуральной жидкости.

6. Выберите из нижеперечисленного, в чем заключается действие β-лактамных антибиотиков на пептидогликан:

- прекращение его синтеза;
- гидролиз гликановых нитей;
- предотвращение замыкания пептидных мостиков;
- подавление активности транспептидаз пептидогликана.

7. Укажите, в чем состоит отличие актиномицетов как продуцентов антибиотиков от бактерий-продуцентов антибиотиков:

- они являются многоклеточными;
- они имеют сложный цикл развития;
- они образуют спороносцы и споры;
- их клеточная стенка состоит из пептидогликана.

Приведите примеры антибиотиков, образуемых актиномицетами.

8. Укажите, какие организмы из нижеприведенных чаще всего являются продуцентами антибиотиков:

спорообразующие бактерии;

- водоросли;
- актиномицеты;
- плесневые грибы.

Перечислите названия антибиотиков, образуемых родами *Streptomyces* и *Micromonospora*.

9. Укажите, донорами фрагментов каких кислот является АТФ или ацетилкоэнзим А при инактивации аминогликозидов:

- фосфорной;
- адениловой;
- уксусной;
- щавелевой.

10. Напишите об использовании биотрансформации на примере синтеза витамина С♠. Какие бактерии применяют на одном из этапов синтеза, обеспечивая максимальный выход целевого продукта, и как достигается повышение дыхательной активности бактерий?

11. Укажите способы выращивания клеток, необходимых для синтеза продуктов вторичного метаболизма.

Клетки:

- растительных организмов;
- высших животных. Способы выращивания:
- в виде каллуса на поверхности твердой питательной среды;
- в монослое на твердых подложках;
- в суспензиях на поверхности плавающих носителей;
- в суспензиях в жидких средах;
- в коллоидных растворах.

Приведите пример каллуса *Atropa belladonna* и *Rauwoljia serpentine;* в каком случае данные культуры могут синтезировать тропановые алкалоиды (имеется в виду такой признак каллуса, как дифференцированные и недифференцированные корневые каллусы этих растений). Приведите определение тотипотентности.

12. Укажите, когда хромосомные гены могут быть «мобилизованы», то есть:

- когда они оказываются в плазмиде;
- когда они включены в фаговую ДНК;
- когда они выходят из плазмиды;
- когда они мутируют;
- когда они находятся в конъюгативном транспазоне.

13. Укажите, что необходимо добавить в среду, содержащую кукурузный экстракт, для выращивания пропионовых бактерий в процессе получения витамина B_{12}:

крахмал;

- глюкозу;
- соли кобальта;
- сульфат аммония.

Напишите о применении методов генной инженерии для увеличения выхода целевого продукта. В чем заключаются отличия высокопродуктивного штамма от других продуцентов при использовании метода иммобилизации клеток?

14. В промышленном производстве белково-витаминного концентрата при выращивании на грибах *Candida maltosa* разработана технология получения убихинона-9 с одним из известных вам витаминов. Выберите название этого витамина из нижеприведенных:

- рибофлавин;
- эргостерин^{p};
- аскорбиновая кислота;
- β-каротин$^{\spadesuit}$. Напишите:
- что представляют собой убихиноны с химической точки зрения;
- является ли их поступление в организм с пищей обязательным;
- какую роль играют убихиноны в организме человека.

15. Укажите отличия преднизолона от гидрокортизона в качестве ЛС:

- более низкая противовоспалительная активность;
- более высокая противовоспалительная активность;
- более выраженная антиаллергическая способность;
- менее выраженная антиаллергическая способность;
- менее выраженное проявление побочных эффектов. Напишите название штамма микроорганизма, участвующего в стадии преобразования гидрокортизона в преднизолон.

16. Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают ферменты, среди которых (из нижеприведенных) укажите протеолитические ферменты:

- стрептокиназа;
- урокиназа;

- β-галактоза;
- трипсин.

Каковы показания к применению этих ферментов в лечебных целях?

17. Укажите из нижеприведенных ферментов тиолзависимые цистеиновые протеазы:

- химозин;
- фицин;
- бромелин;
- папаин.

Напишите, в каком случае подавляется активность тиолзависимых протеиназ.

18. Укажите функциональные особенности витаминов в отличие от других незаменимых факторов питания (жирных кислот, аминокислот и др.):

- являются источниками энергии;
- не являются источниками энергии;
- являются материалом для биосинтеза в организме;
- не являются материалом для биосинтеза в организме;
- функционируют как регуляторы биохимических реакций обмена веществ.

Каковы основные источники витаминов в биотехнологическом производстве? Допишите фразу: «Как правило, высокой биологической активностью обладают не сами витамины, а ...».

19. Поиск нативных продуцентов, образующих значительные количества витамина B_{12} на средах из непищевого сырья, связан с источниками углерода и энергии, в качестве которых используют:

- пропиловый спирт;
- изопропиловый спирт;
- метанол;
- крахмал.

20. Укажите биотехнологические способы получения коферментной формы никотиновой кислоты (НАД):

- культивирование продуцентов;

- экстракция из микроорганизмов;
- культивирование на средах с предшественником целевого продукта;
- получение гибридных штаммов.

Напишите, как влияет проницаемость мембраны клеток на выход целевого продукта.

Курсовой экзамен

Умения и практические навыки. Перечень вопросов по умениям

и навыкам в работе биотехнолога (итоговый контроль первого уровня)

Тема 1. Антибиотики

1. Выделение почвенных микроорганизмов как объектов для скрининга биологически активных соединений. Культивирование и изучение морфологических характеристик микроорганизмов.

2. Краткие теоретические основы культивирования и определения морфологических характеристик микроорганизмов, используемых при скрининге БАВ.

3. Природные БАВ и основные подходы для их скрининга.

4. Систематическое положение микроорганизмов-продуцентов БАВ *(Bacillus, Actinomyces, Fungi),*специфичность продуцируемых ими соединений. Выделение из почвы, культивирование и изучение морфологических характеристик микроорганизмов. Основные методы хранения микроорганизмов.

5. Особенности биосинтеза микроорганизмов-продуцентов антибиотиков.

6. Поиск и характеристика микроорганизмов-продуцентов антибиотиков.

7. Сравнение морфологических характеристик основных продуцентов при поверхностном и глубинном культивировании.

8. Микробиологические методы определения антибиотической активности.

9. Микробиологические методы определения чувствительности к антибиотикам и их концентрации.

10. Изучение антибиотикочувствительности.

11. Определение концентрации (активности) антибиотиков.

12. Метод диффузии в агар.

13. Метод серийных разведений.

14. Стандартизация методов определения концентрации антибиотиков и чувствительности к ним.

15. Выделение антибиотиков из культуральной жидкости, определение подлинности антибиотиков и их количественный анализ.

16. Методы выделения антибиотиков.

17. Методы анализа.

18. Качественный анализ.

19. Определение антибиотиков омомицина^{р} и галтамицина^{р} в экстрактах культуральной жидкости с помощью ТСХ на пластинках «Силуфола».

20. Количественное определение антибиотиков.

21. Определение фузидовой кислоты.

22. Изучение морфологических характеристик микроорганизмовпродуцентов БАВ в различные фазы роста при глубинном культивировании; выбор оптимальных параметров биосинтеза.

23. Теоретические основы биосинтеза антибиотиков.

24. Продуцент как саморегулируемая система.

25. Технологическая схема процесса микробного синтеза.

26. Посевной материал.

27. Ферментация, стадии роста и биосинтеза.

28. Состав среды и условия ферментации.

29. Управляемые процессы ферментации.

30. Изучение микроморфологических особенностей продуцентов БАВ на разных стадиях культивирования (трофофаза, идиофаза) с выбором оптимальных условий процесса биосинтеза антибиотика.

31. Определение оптимальных параметров ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина.

Тема 2. Аминокислоты

32. Применение аминокислот в медицине.

33. Штаммы-суперпродуценты.

34. Технология получения аминокислот.

35. Ферментация треонина; идентификация и определение содержания этой аминокислоты в культуральной жидкости.

36. Процесс ферментации треонина в ферментере в условиях интенсивной аэрации и pH-статирования при дробной подаче в среду источников углерода и азота по сигналу от датчика pH.

37. Определение аминокислот методом ТСХ.

Тема 3. Витамины и коферменты

38. Биотехнологическое использование микроорганизмов при получении витамина C^{*}.

39. Трансформация D-сорбита в L-сорбозу микроорганизмами вида *Gluconobacter oxydans.*

40. Биотехнологическое использование микроорганизмов при получении убихинона-10.

41. Характеристика убихинонов.

42. Промышленное получение убихинонов.

43. Методы выделения и количественного определения убихинонов.

44. Способы экстракции убихинонов из биообъектов.

45. Хроматографические методы выделения убихинонов.

46. Количественное определение убихинона-10 из биомассы бактерий *Gluconobacter oxydans.*

Тема 4. Стероидные гормоны

47. Использование биотехнологических методов при получении стероидных гормонов.

48. Микробиологические трансформации.

49. Проведение биотрансформации гидрокортизона в преднизолон с помощью иммобилизованных клеток*A. globiformis.*

50. Определение оптимальных условий процесса биотрансформации гидрокортизона в преднизолон.

51. Определение степени биотрансформации.

52. Реакции дегидрирования.

53. Окислительное отщепление боковой цепи ситостерина^{p} и образованием АД с помощью микроорганизмов-биотрансформаторов.

54. Микробиологическая трансформация стероидных гормонов с помощью иммобилизованных клеток*Arthrobacter globiformis.*

Тема 5. Пробиотики

55. Препараты на основе живых культур молочнокислых бактерий.

56. Микрофлора человека.

57. Определение концентрации жизнеспособных клеток лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков.

58. Приготовление питательных сред для учета лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков.

59. Проведение микроскопического исследования этих культур.

60. Определение концентрации жизнеспособных клеток.

61. Определение активной и титруемой кислотности.

Тема 6. Биопрепараты растительного происхождения

62. Препараты на основе биомассы растений, полученной *in vitro*.

63. Каллусные технологии.

64. Получение каллусной культуры клеток и оценка ее качества.

65. Получение первичного каллуса.

66. Определение митотического индекса.

67. Определение экстрактивных веществ.

68. Проведение качественных реакций на гликозиды, стероидные соединения, крахмал.

Тема 7. Иммобилизованные биообъекты

69. Преимущества иммобилизации изолированных ферментов и целых микробных клеток.

70. Иммобилизация клеток *E. coli* - продуцента пенициллинацилазы - и получение 6-АПК.

71. Приготовление геля альгината кальция.

72. Иммобилизация в твердом носителе клеток *E. coli,* продуцирующих пенициллинацилазу.

73. Качественное и количественное определение 6-АПК, образовавшейся из бензилпенициллина.

74. Влияние условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток.

75. Иммобилизация микробных клеток в ПААГ.

76. Изучение влияния условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток.

Тема 8. Рекомбинантные белки

77. Теоретические аспекты получения видоспецифических белков человека с помощью рекомбинантных штаммов.

78. Анализ культуры клеток *E. coli* на присутствие вектора, продуцирующего инсулин.

79. Выделение и анализ плазмидной ДНК.

80. Разрушение клетки и отделение плазмидного вектора (ДНК).

81. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК в агарозе.

Тема 9. Вакцины

82. Классификация вакцин.

83. Живые вакцины.

84. Инактивированные вакцины.

85. Технология получения противокоревой вакцины.

86. Приготовление вакцинного штамма.

87. Заражение вакцинного штамма посевным вирусом.

88. Контроль специфической активности вируса кори.

Тестовый контроль. Тестовые вопросы по курсу биотехнологии (итоговый контроль второго уровня)

1. Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации биообъекта необходимо для:

- усиления эффективности включения фермента в гель;
- повышения сорбции фермента;
- повышения активности фермента;
- образования ковалентной связи.

2. Активный ил, применяемый при очистке промышленных стоков фармацевтического производства:

- сорбент;
- смесь сорбентов;
- смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами;
- природный комплекс микроорганизмов.

3. Биосинтез антибиотиков, используемых в качестве ЛС, усиливается и наступает раньше на средах:

- богатых источниками азота;
- богатых источниками углерода;
- богатых источниками фосфора;
- бедных питательными веществами.

4. Биотехнологи используют рестриктазу, распознающую и разрезающую ДНК следующим образом:

- одновременно обе комплементарные нити ДНК;
- одну из комплементарных нитей ДНК;
- со специфической последовательностью из 2-3 пар нуклеотидов;
- со специфической последовательностью из 5-6 пар нуклеотидов.

5. Ген-маркер необходим биотехнологу для:

- повышения активности рекомбинанта;
- образования компетентных клеток хозяина;
- модификации места взаимодействия рестриктаз с субстратом;
- отбора рекомбинантов.

6. Вектор на основе плазмиды предпочтительнее вектора на основе фаговой ДНК вследствие:

- больших размеров;

меньшей токсичности;

- большой частоты включения;
- отсутствия лизиса клетки хозяина.

7. Выделение и очистка продуктов биосинтеза и органического синтеза имеют принципиальные различия на определенных стадиях процесса:

- на всех стадиях;
- на конечных;
- на первых;
- принципиальных различий нет.

8. Геномика при скрининге антимикробных лекарств позволяет предвидеть:

- стоимость ЛС;
- спектр антимикробного действия;
- наличие побочных эффектов;
- скорость развития резистентности;
- способы выделения.

9. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:

- половой совместимостью;
- половой несовместимостью;
- совместимость не имеет существенного значения.

10. Для приготовления питательных сред в производстве антибиотиков целесообразно использовать воду:

- дистиллированную;
- стерильную;
- питьевую;
- из открытых водоемов после соответствующей обработки.

11. Для протопластирования наиболее подходят суспензионные культуры:

- в лаг-фазе;
- в фазе ускоренного роста;
- в логарифмической фазе;
- в фазе замедленного роста;
- в стационарной фазе;
- в фазе отмирания.

12. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика определяется:

- низким сродством рибосом;
- активным выбросом;
- временной ферментативной инактивацией;
- компартментацией.

13. Клетки продуцентов иммобилизуют в случае, если целевой продукт:

- водорастворим;
- нерастворим в воде;
- локализован внутри клетки;
- является биомассой клеток.

14. Какое сырье применяют в качестве источника азота при производстве пенициллина?

- Кукурузный экстракт.
- Соевую муку.
- Аммофос.

Кукурузную муку.

15. К β-лактамным антибиотикам относят:

- пенициллины;
- циклоспорины;
- карбопенемы;
- цефалоспорины;
- макролиды.

16. Микобактерии-возбудители современной туберкулезной инфекции устойчивы к химиопрепаратам вследствие:

- компенсаторных мутаций;
- медленного роста;
- внутриклеточной локализации;
- однокопийности оперона;
- ослабления иммунитета организма хозяина.

17. Мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов является:

- ДНК;
- ДНК-полимераза;
- РНК-полимераза;
- рибосома;

• информационная РНК.

18. Моноклональные антитела на производстве получают:

• при фракционировании антител организмов;

• фракционированием лимфоцитов;

• с помощью гибридомной технологии.

19. Объединение геномов клеток разных видов и родов возможно при соматической гибридизации:

• только в природных условиях;

• только в искусственных условиях;

• в природных и искусственных условиях.

20. Ослабление ограничений на использование в промышленности микроорганизмов-рекомбинантов, продуцирующих гормоны человека, стало возможным благодаря:

• совершенствованию методов изоляции генно-инженерных рекомбинантов от окружающей среды;

• повышению квалификации персонала, работающего с рекомбинантами;

• установленной экспериментально слабой жизнеспособности продуцента;

• экспериментальному подтверждению потери чужеродных генов.

21. Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией состоит в:

• доступности реагентов;

• избирательности воздействия на определенные функциональные группы стероида;

• сокращении времени процесса;

• получении принципиально новых соединений.

22. Особенностью пептидных факторов роста тканей является:

• тканевая специфичность;

• видовая специфичность;

• образование их железами внутренней секреции;

• образование их вне желез внутренней секреции.

23. Понятию «биообъект» соответствуют следующие определения:

- организм, на котором испытывают новые биологически активные соединения;
- организм, вызывающий контаминацию биотехнологического оборудования;
- фермент, используемый в аналитических целях;
- организм, продуцирующий биологически активные соединения;
- ферментпромышленный катализатор.

24. Возникновение множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:

- непроницаемостью мембраны;
- ферментативной инактивацией;
- уменьшением сродства внутриклеточных мишеней;
- активным выбросом (механизм помпы).

25. Правила GMP предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании следующих групп антибиотиков:

- пенициллинов;
- аминогликозидов;
- тетрациклинов;
- макролидов;
- полиенов.

26. Правила GMP предусматривают проведение валидации при:

- замене биообъекта более продуктивным;
- изменении состава питательной среды;
- окончании календарного года;
- ежеквартально;
- при обновлении штата сотрудников предприятия.

27. Преимуществом генно-инженерного инсулина является его:

- высокая активность;
- меньшая аллергенность;
- меньшая токсичность;

• большая стабильность.

28. Преимуществами иммобилизации клеток с повышенной проницаемостью оболочки являются:

• длительное сохранение жизнеспособности;

• большее связывание с носителем;

• повышение скорости диффузии субстрата;

• повышение скорости выхода целевого продукта.

29. Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза (выбрать из нижеперечисленных):

• простота оборудования;

• экономичность;

• отсутствие дефицитного сырья;

• снятие этических проблем.

30. Преимуществом РИА по сравнениею с определением инсулина по падению концентрации глюкозы в крови животных является:

• меньшая стоимость анализа;

• ненужность дефицитных реагентов;

• легкость освоения метода.

31. При выделении ферментов эффективность центрифугирования зависит от:

• молекулярной массы фермента;

• количества субъединиц;

• наличия кофермента.

32. При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют следующие штаммы-деструкторы (выбрать из перечисленного):

• природные микроорганизмы;

• постоянные компоненты активного ила;

• стабильные генно-инженерные штаммы.

33. Причина высокой эффективности антибиотических препаратов уназина* и аугментина* заключается в:

- невысокой токсичности (по сравнению с ампициллином и амоксициллином);
- невысокой стоимости;
- действии на резистентные к β-лактамам штаммы бактерий;
- пролонгации эффекта.

34. Причина невозможности непосредственной экспрессии гена человека в клетке прокариот:

- высокая концентрация нуклеаз;
- невозможность репликации плазмид;
- отсутствие транскрипции;
- невозможность сплайсинга.

35. Протеомика характеризует состояние микробного патогена по:

- ферментативной активности;
- скорости роста;
- экспрессии отдельных белков;
- нахождению на конкретной стадии ростового цикла.

36. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:

- микроинъекции;
- трансформации;
- упаковки в липосомы;

культивирования протопластов на соответствующих питательных средах.

37. Разработанная технология получения рекомбинантного эритропоэтина основана на экспрессии гена в:

- клетках бактерий;
- клетках дрожжей;
- клетках растений;
- культуре животных клеток.

38. Регулируемой ферментации в процессе биосинтеза достигают при определенном способе культивирования:

- периодическом;
- непрерывном;
- отъемно-доливном;
- полупериодическом.

39. Ретроингибирование при биосинтезе БАВ - это:

- подавление последнего фермента метаболической цепи;
- подавление начального фермента метаболической цепи;
- подавление всех ферментов метаболической цепи.

40. Сигнальная трансдукция - это:

- передача сигнала от клеточной мембраны в геном;
- инициация белкового синтеза;
- посттрансляционные изменения белка;
- выделение литических ферментов.

41. Скрининг ферментов для получения полусинтетических β-лактамов необходим из-за:

- нестабильности ферментов;
- патентования ранее полученных ферментов;
- высокой стоимости коммерческих препаратов;
- различной субстратной специфичности.

42. Полный ферментный комплекс называют:

- апоферментом;
- коферментом;
- холоферментом;
- кофактором.

43. Способы хранения микробных биообъектов могут быть следующие:

- на сыпучих материалах;
- под слоем масла;
- в физиологических растворах;

- на питательной агаровой среде;
- в спиртовых растворах;
- при сверхнизких температурах.

44. Подаваемый в ферментер стерильный воздух выполняет следующие функции:

- обеспечивает микроорганизмы кислородом;
- служит для теплоотвода;
- отводит газообразные продукты обмена;
- препятствует пенообразованию;

поддерживает pH среды на оптимальном уровне;

- увеличивает скорость массообменных процессов.

45. Термин «нормофлоры» характеризует:

- пробиотики;
- эубиотики;
- микробиотики;
- молочнокислые бактерии.

46. Термину «вектор» в генной инженерии соответствуют:

- плазмида с чужеродным геном;
- чужеродный ген, включенный в хромосому;
- участок клеточной мембраны, не защищенный клеточной стенкой;
- хромосома клетки хозяина;
- фаговая ДНК с чужеродным геном.

47. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют следующим способом:

- нагреванием;
- фильтрованием;
- облучением.

48. Трансферазы осуществляют:

- катализ окислительно-восстановительных реакций;

- перенос функциональных групп на молекулу воды;
- катализ реакции присоединения по двойным связям;
- катализ реакций переноса функциональных групп.

49. Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероида достигается при:

- увеличении интенсивности перемешивания;
- увеличении интенсивности аэрации;
- повышении температуры ферментации;
- увеличении времени ферментации;
- увеличении концентрации стероидного субстрата в ферментационной среде;
- целенаправленном изменении химической структуры стероидного субстрата.

50. Указать правильную последовательность операций при подготовке технологического воздуха:

- охлаждение воздуха в теплообменнике;
- сжатие воздуха в компрессоре;
- очистка атмосферного воздуха от взвешенных частиц;
- отделение от конденсата;
- поддерживание заданной температуры и влажности в головном фильтре, холодная стерилизация;
- стерилизация воздуха в индивидуальном фильтре.

Условием сохранения протопластов (применительно к методу клеточной инженерии) является:

- низкая температура;
- наличие в среде ПЭГ (полиэтиленоксида);
- наличие в среде буфера;
- гипертоническая среда.

52. ФУК как предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют:

- перед ферментацией;
- в начале ферментации;

- на 2-3 сутки после начала ферментации;
- каждые сутки в течение 5-суточного процесса.

53. Функцией феромонов является:

- антимикробная активность;
- противовирусная активность;
- изменение поведения организма со специфическим рецептором;
- противоопухолевая активность.

54. Цели иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве (выбрать из нижеперечисленных):

- повышение удельной активности;
- повышение стабильности;
- расширение субстратного спектра;
- многократное использование.

55. Эмбриональные ткани используют при получении вакцин против:

- гриппа;
- полиомиелита;
- бешенства;
- брюшного тифа;
- кори.

Ситуационные задачи с вариантами ответов (итоговый контроль третьего уровня)

Задача 1

В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом.

При проведении технологического этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

Проанализируйте ситуацию с точки зрения:

химической реакции биотрансформации, определяющей проведение биосинтеза и получение ожидаемого результата при осуществлении биотрансформации;

• выбора микроорганизмов для биоконверсии и оптимального подбора компонентов питательной среды (источников углерода, азота и фосфора);

• возможности увеличения выхода целевого продукта.

Вариант ответа

Синтез аскорбиновой кислоты по А. Грюсснеру и М. Рейхшейну с 1934 г. представляет собой многостадийный и преимущественно химический процесс, в котором имеется лишь одна стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу с участием уксуснокислых бактерий как классический пример микробиологического производства. Для получения сорбозы культуру продуцента *Gluconobacter oxydans*выращивают в ферментерах периодического действия, оснащенных мешалками и барботерами для усиления аэрации в течение 20-40 ч. Выход сорбозы достигает 98% от исходного сорбита. Питательные среды содержат кукурузный или дрожжевой экстракт (20% от общего количества). По окончании производственного цикла сорбозу выделяют из культуральной жидкости.

Совершенствование этой стадии в части повышения выхода целевого продукта при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза.

Также можно привести пример получения 2-кето-L-гулоновой кислоты (промежуточный продукт синтеза витамина C^{*}), которая легко превращается в аскорбиновую кислоту. Это метод двухстадийного микробиологического синтеза, включающий окисление D-глюкозы в 2, 5-дикето-D-глюконовую кислоту с дальнейшей биотрансформацией в 2-кето-L-гулоновую кислоту. Наиболее продуктивными микроорганизмами, осуществляющими эту реакцию, являются представители родов *Acetobacter, Erwinia, Gluconobacter,* в частности, мутантный штамм *Erwinia punctata,* который обеспечивает выход до 94,5% 2, 5-дикето-D-глюконовой кислоты от общего количества исходной глюкозы.

Задача 2

Довольно часто при получении ЛС биотехнологическими методами синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до целевого продукта. В этом случае на помощь приходит биотрансформация (биоконверсия), которая особенно эффективна в бактериальных клетках, но в ряде случаев такой процесс можно провести и с помощью культур растительных клеток, осуществляющих самые различные реакции биотрансформации, такие, как гидроксилирование, изомеризация, этерификация и т.д., что в результате приводит к структурно-функциональным изменениям трансформируемого химического соединения.

Успешно применяют биотрансформацию карденолидов, гликозиды которых широко распространены в практике лечения болезней сердца. В качестве примера можно привести биотрансформацию растения*Digitalis Lanata.*

Проанализируйте метод биотрансформации с точки зрения:

• оптимизации условий проведения биотрансформации как метода получения ЛС и ожидаемого результата данной биотрансформации;

• принципиального функционального отличия между тканями *Digitalis Lanata* и культурами клеток этого растения;

• целесообразности использования метода иммобилизации клеток растения *Digitalis Lanata.*

Вариант ответа

Известно, что биотрансформация - метод, использующий локализованные в клетках растения ферменты, которые обладают способностью изменять функциональные группы добавляемых извне

химический соединений. Этот метод применяют в основном для повышения биологической активности конкретной химической структуры посредством серии специфических химических реакций одним или несколькими последовательно связанными ферментами. В качестве примера можно привести биотрансформацию дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis Lanata.* Использование в клинической практике дигоксина предпочтительнее вследствие меньшей его токсичности по сравнению с дигитоксином. При этом необходимо отметить, что при экстрагировании БАВ из биомассы плантационновыращиваемых растений преобладает в основном дигитоксин.

При решении данной проблемы можно использовать недифференцированные культуры клеток (суспензии)*Digitalis Lanata,* которые сами по себе не образуют сердечных гликозидов, но вполне успешно могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавляемых в питательную среду.

Биотрансформация дигитоксина в дигоксин происходит за счет реакции 1, 2-гидроксилирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis Lanata.* В данном случае целесообразно применять иммобилизацию растительных клеток путем встраивания их в альгинат кальция или в агарозные шарики, или в сетчатые структуры из нейлона, полиуретана и др. Иммобилизация растительных клеток дает преимущество по сравнению с суспензионными культурами:

• многократное использование биомассы;

• четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма;

• увеличение продолжительности культивирования на стадии продуцирования;

• получение большего количества вторичных метаболитов. Задача 3

При получении генно-инженерного инсулина, основанного на раздельном биосинтезе 2 цепей, в качестве продуцента используют определенные микроорганизмы и модифицированный чужеродный ген (точнее, оперон) с лидерной последовательностью аминокислот (метионином и β-галактозидазой), отделяемой на последней стадии контакта секретируемого белка и клетки. Ферментацию проводят на среде с лактозой (или галактозой) для последующего объединения свободных инсулиновых цепей. Далее осуществляют выделение и очистку полученного инсулина.

На основе общей схемы получения инсулина и требований к его качеству проанализируйте и обоснуйте:

• условия выбора конкретного продуцента инсулина и конструкцию вектора, с помощью которого можно ввести в клетку чужеродный ген (ген инсулина);

необходимость использования лидерной последовательности аминокислот с метионином и β-галактозидазой в синтезе инсулина и роль лактозы (галактозы) в процессе ферментации и получении завершенных инсулиновых цепей и их объединении;

• возможность проявления токсичности генно-инженерного инсулина; с чем это может быть связано, учитывая видоспецифичность данного инсулина, его серийное качество и уровень культуры производства на предприятии?

Прокомментируйте правила безопасности работы с микроорганизмами на генетическом и физическом уровнях.

Вариант ответа

Выбор конкретного продуцента рекомбинантных белков, в частности инсулина, предусматривает его промышленное применение в качестве суперпродуцента. В этом отношении можно предложить использовать *Bacillus subtilis, Saccaromyces cerevisiae* и др. микроорганизмы, которые могут секретировать целевой продукт в культуральную жидкость. Преимуществом *Esherichia coli* по сравнению с этими микроорганизмами считают то, что синтезируемые кишечной палочкой чужеродные белки депонируются внутри клеток в виде белковых тел (так называемых Dense bodies) и недоступны для действия протеаз, от которых нет защиты у других вышеуказанных продуцентов. Применение *Esherichia coli* в качестве промышленного штамма также целесообразно благодаря наиболее низкому уровню опасности для персонала и окружающей среды, что достигается обеспечением фильтрами всех линий, через которые происходят газовые выбросы из ферментеров, и термической стерилизацией всех стоков, содержащих биоматериал.

Схема получения рекомбинантного инсулина по «Eli Lilly» (США)

• Химический синтез генов, кодирующих образование цепей А и В в определенной последовательности нуклеотидов.

• Конструирование вектора.

Введение каждого синтетического гена в плазмиду: в одну - ген, синтезирующий цепь А, в другую - ген, синтезирующий цепь В.

- Для интенсивной репликации плазмид в каждую из них вводят также ген, кодирующий образование фермента β-галактозидазы.

• Введение полученных плазмид в клетку *Escherichia coli* с последующим получением двух культур продуцента, одна из которых синтезирует цепь А, а другая цепь В.

• Культуры помещают в ферментер, в культуральную среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента β-галактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются и в результате получается большое количество генов, синтезирующих цепи А и В.

• Клетки лизируют, выделяют цепи А и В, которые обрабатывают бромцианом для отщепления от них β-галактозидазы.

• Затем следует очистка и выделение А и В-цепей.

• Далее окисляют остатки цистеина и соединяют цепи А и В.

Полученный генно-инженерный человеческий инсулин не вызывает аллергических реакций, так как он видоспецифичен, и если в нем находят какие-либо недопустимые примеси в виде эндотоксинов и пирогенов, то это относится только к нарушениям в технологии его изготовления и культуры производства.

Задача 4

В настоящее время существует международная программа системы поиска и отбора антимикробных агентов, подавляющих размножение патогена только в инфицированном организме, т.е. система, позволяющая клонировать гены, которые не экспрессируются в искусственных условиях *(in vitro).* Данная система подразумевает использование определенных методов, реактивов (наборы для клонирования, рестриктазы), тест-объектов и решает такие задачи, как:

• выделение и очистка ДНК (электрофорез);

• культивирование патогенов, например *Salmonella typhimurium;*

создание вектора на основе плазмиды, несущей беспромоторные гены хлорамфеникол-ацетилцетилтрансферазы и лактозного оперона;

• заражение лабораторных животных (мыши);

• высев патогенов из животных объектов.

Расположите последовательно этапы данной системы скрининга антимикробных агентов, учитывая применение:

- генно-инженерных методов при получении набора различных плазмид;
- набора различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы;
- индикаторной среды для отбора нужных колоний.

Прокомментируйте результаты и возможности применения данной системы при поиске антимикробных агентов, используемых в качестве ЛС.

Вариант ответа

У патогенных микроорганизмов открыты гены, имеющие значение для инфекционного процесса, но несущественные при росте *in vitro*. В последнем случае эти гены не поддаются идентификации для их дальнейшего использования в качестве мишеней при поиске новых ЛС. Так называемые молчащие *in vitro*гены патогенных микроорганизмов получили название «ivi-генов» (генов вирулентности). Однако в случае дефицита каких-либо из жизненно необходимых клетке веществ возможно преобразование данных генов из молчащих («несущественных») в «существенные». Подавление их функций антимикробными агентами приводит к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo,* т.е. в инфицированном организме. Именно поэтому поиск и идентификация генов вирулентности являются конечной целью исследователей, создающих новые антимикробные лекарственные препараты.

В качестве примера такой работы можно привести метод IVET *(in vivo expression technology).*

Суть метода. Геном патогенной бактерии *(Salmonella typhimurium)* с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов, кратных 1, 2, 3 и т.д.

Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетил трансферазы *(cat).* Такой ген без промотора не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако он смог бы реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы) имел бы промотор для своей собственной репликации. Тогда этот промотор вызвал бы репликацию не только своего гена, но и репликацию следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы может происходить благодаря использованию или «захвату» чужого промотора. Полученный фрагмент является сдвоенным (x-cat, где *x* - фрагмент генома сальмонеллы, а *cat* - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы).

• К этому сдвоенному фрагменту присоединяют лактозный оперон, также лишенный промотора *(lac Z).*Данный оперон необходим для системы окисления лактозы. На этом этапе генные инженеры получают фрагмент, состоящий уже из 3 частей: *x-cat-lac Z.*

• Полученный фрагмент *(x-cat-lac Z)* включают в плазмиду. В результате всех манипуляций у генного инженера имеется набор плазмид, отличающихся только по фрагменту *x.*

• Эти плазмиды с разными частями генома сальмонеллы вводят в клетку *E. coH.*

• Далее следует внедрение клеток *E. coH* в организм лабораторного животного (мыши) с одновременным введением ему (ей) хлорамфеникола.

• Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру, из которой вырастают колонии красного и белого цвета: колонии красного цвета (окисляющие лактозу и меняющие pH) составляют 90%, а белого (бесцветные) - 10%.

• Затем колонии анализируют.

Ход рассуждений следующий: если колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветной, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах «х» не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам *ivi* (генам вирулентности). В случае колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате цвет индикатора изменяется, вызывая окрашивание колоний в красный цвет.

Таким путем из клеток *Salmonella typhimurium* было выделено около 100 ivi-генов, из которых 50 были абсолютно новыми (не описанными ранее). Они представляли интерес как потенциальные мишени для отбора антимикробных агентов.

Задача 5

При получении штаммов суперпродуцентов аминокислот, таких, как треонина или лизина, используют микроорганизмы *Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Bacillus subtilis.* В одном случае биосинтез аминокислоты идет одновременно с ростом биомассы (путь получения аминокислоты одностадийный), в другом случае сначала идет рост биомассы и только потом синтез аминокислоты (путь двухстадийный).

В данной ситуации получения аминокислот обоснуйте:

• преимущества биосинтеза перед органическим синтезом и подбор соответствующих микроорганизмов для получения штаммовпродуцентов, способных к сверхсинтезу нужной аминокислоты, если конечным продуктом будет лизин или треонин;

• выбор пути биосинтеза для лизина или треонина и особенности питательных сред;

• условия ферментации (подготовительная стадия и биосинтез).

Вариант ответа

Современными методами тонкого органического синтеза можно синтезировать D и L-формы аминокислот в любых количествах, но все существующие способы их производства приводят к образованию рацематов. Таким путем можно получать рацематы лизина, глутаминовой кислоты, триптофана и других аминокислот. Вместе с тем

химический синтез невозможен без достаточно большого количества агрессивных и токсичных веществ, что требует проведения дополнительных организационных мероприятий и финансовых затрат для их утилизации. Кроме того, подобные соединения небезопасны для персонала. Получение 100% биологически активной L-формы аминокислот методом органического синтеза - процесс очень сложный и экономически оправдан лишь в редких случаях.

Альтернативой химическому синтезу служит микробиологический процесс, при котором специально подобранные селекционные или сконструированные методами генной инженерии штаммыпродуценты способны осуществлять сверхсинтез аминокислот, например L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-триптофана, L-треонина в значительных количествах, что является определяющим фактором при выборе технологии производства аминокислот в промышленном масштабе. Однако при биосинтетическом получении в фармацевтической промышленности товарных форм L-аминокислот для кормового, пищевого или медицинского применения необходимо также использование тонкого органического синтеза на стадиях выделения, концентрирования и очистки субстанций аминокислот.

Микробиологическое промышленное производство L-амино- кислот можно осуществлять по двум технологическим схемам.

Двухступенчатый способ предполагает образование и подготовку предшественника, а также биосинтез ферментного препарата микробного происхождения, который будет трансформировать предшественник в целевую аминокислоту. Это первая ступень. Вторая ступень - собственно процесс трансформации полученного на 1 стадии предшественника в аминокислоту с помощью ферментных систем микроорганизмов. Таким путем получают, в частности, L-лизин.

Одноступенчатый способ синтеза аминокислот с помощью микроорганизмов основан на культивировании строго определенного штамма-продуцента целевой аминокислоты на среде определенного состава при соответствующих параметрах ферментационного процесса.

Промышленный штамм должен обладать способностью к сверхсинтезу нужной аминокислоты. Для этой цели выбирают полиауксотрофные мутанты, т.е. те клетки микроорганизмов, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для роста и развития клетки различные аминокислоты, а с другой - приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты.

Микроорганизмы осуществляют контроль биосинтеза каждой аминокислоты по принципу обратной связи как на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), так и на уровне самих ферментов, способных при избытке аминокислоты изменять свою активность (ретроингибирование), что совершенно исключает перепроизводство аминокислоты клеткой в природных условиях. Из этого следует, что целью биотехнолога является нарушение этих систем регуляции с дальнейшим отбором ауксотрофных мутантов на селективных средах с использованием мутагенов (УФ,

рентгеновские лучи, нитрозосоединения и др.). Такие мутанты имеют в геноме дефектный ген, детерминирующий фермент, без которого не может осуществляться биосинтез определенной аминокислоты. Важно, что получение ауксотрофных мутантов-продуцентов аминокислоты возможно только для микроорганизмов с разветвленной цепью биосинтеза, т.е. по крайней мере две аминокислоты должны синтезироваться из одного предшественника. У таких ауксотрофных мутантов избыток одной аминокислоты при дефиците другой не приводит к подавлению активности первого фермента. Однако аминокислота, биосинтез которой нарушен, должна быть добавлена в ограниченном количестве (при синтезе лизина добавляется гомосерин или треонин на 1-й стадии). Продуцент лизина - *Corynebacterium glutamicum* (коринебактерии) - имеет единственную β-аспартакиназу (фермент), активность которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи. Этот мутантный штамм-продуцент является ауксотрофом по гомосерину и треонину. Для длительной работы ауксотрофных штаммов-продуцентов лизина в питательную среду вносят белковые гидролизаты в режиме дробной подачи (комплекс аминокислот).

Для получения L-треонина используют промышленный мутантный штамм *E. coH* (энтеробактерии), где система регуляции биосинтеза аминокислоты основана на принципе дифференциальной регуляции изоферментами. Этот штамм - тройной ауксотроф. У него изменен 1 фермент цепи биосинтеза (нечувствительный к треонину), отсутствуют механизмы репрессии («хроническое голодание» по изолейцину), при помощи методов генной инженерии треониновые гены размножены на плазмидах, что значительно увеличило продуктивность штамма.

При получении аминокислоты методами прямого микробиологического синтеза применяют полупериодическую ферментацию (регулируемую) с хорошей аэрацией (барботер) и перемешиванием (мешалка).

Задача 6

Одно из существенных мест на фармацевтическом рынке занимают стероидные гормоны, являющиеся не только жизненноважными, но и использующиеся как ЛС, обладая большой широтой спектра и высокой избирательностью физиологического воздействия. Известно, что с момента установления структуры основных стероидных гормонов в качестве метода получения лекарственных препаратов этих соединений стали применять биотрансформацию.

Проанализируйте:

• зависимость биологической активности от структуры стероидных гормональных препаратов;

• достоинства и недостатки сырья, используемого при получении гормональных стероидных препаратов;

• возможности использования биотрансформации при получении наиболее ценных гормональных препаратов.

Вариант ответа

Обширный класс стероидов характеризуется наличием в молекуле специфического циклического скелета - циклопентанпергидрофенантрена, состоящего из 4 сконденсированных колец, 3 из которых - шестичленные (А, В и С), 1 - пятичленное. К стеринам (стеролам) относят стероиды, несущие в положении C_3 гидроксильную группу. Одним из наиболее изученных стеринов (класс зоостеринов) является холестерин. Другие стерины в природе отличаются от холестерина или по длине боковой цепи, или по степени насыщенности.

В процессе образования стероидных гормонов из холестерина сначала образуется прегненолон - основной промежуточный продукт биосинтеза стероидов и кортикостероидов.

При получении из прогестерона гормональных препаратов кортикостерона[р] и гидрокортизона (кортизол[р]), тестостерона и эстрона их биологическая активность связана с биотрансформацией структуры стероидов:

окисление гидроксила в 3 положении;

• отщепление боковых цепей в 17 положении;

• введение Δ-1, 2-двойной связи (дегидрирование);

• гидроксилирование в 11-β положении

(в целом функциональные группы в положении 3, 11, 16, 17 обусловливают физиологическую активность большинства стероидных препаратов).

Поскольку химические методы синтеза стероидов приводят к образованию сложной смеси продуктов окисления как по боковой цепи, так и по системе конденсированных колец, то наиболее подходящие методы в этом случае - микробиологическое окисление и дегидрирование.

Таблица 15. Основные типы биотрансформации стероидов, активно используемые в фармацевтической промышленности

Реакция	Субстрат	Продукт	Микроорганизм-трансформатор
11α-гидро-ксилирование	Прогестерон	11α-гидрокси-прогестерон	*Rhizopus nigricans*
11β-гидро-ксилирование	Вещество S	Гидрокортизон	*Curvularia lunata*
16α-гидро-ксилирование	9α-фторкортизол[р]	9α-фтор16α-гидроксикортизол[р]	*Streptomyces roseo-chromogenus*
1, 2-дегидриро-вание	Гидрокортизон	Преднизолон	*Arthrobacter simplex*
Расщепление боковой цепи	β-ситостерин[р]	АД или андроста-диендион[р]	*Mycobacterium sp.*

Исходным сырьем для производства стероидных препаратов является:

• отечественный соласодин* (низкое процентное содержание стероидов);

• импортный диосгенин[р] и продукты его превращения - АД, андростадиендион[р];

• наиболее экономичен β-ситостерин[р] (растения и отходы переработки древесины).

Задача 7

Как известно, производство витамина B_{12} (кобаламин[р]) является чисто биотехнологическим способом его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используют пропионовые бактерии из рода*Propionibacterium,* выращиваемые на богатой среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина B_{12} - 5, 6-диметилбензимидазола.

В этой ситуации:

• сделайте оптимальный выбор метода ферментации и условий ее проведения;

• докажите необходимость добавления 5,6-диметилбензимидазола в определенное время после начала ферментации и предупредите образование коферментной формы витамина B_{12};

• предложите методы выделения и очистки данного витамина, учитывая место его накопления.

Вариант ответа

В настоящее время промышленное производство витамина B_{12} осуществляют исключительно биотехнологическими методами. Продуцентом витамина B_{12} являются пропионовые бактерии из рода*Propionibacterium.* Добавление в среду предшественника витамина B_{12} - 5, 6-диметилбензимидозола - резко повышает продуктивность продуцента. Повышению продуктивности также способствует и добавка в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки. Выращивание пропионовых бактерий производят периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся

в процессе жизнедеятельности бактерий кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 ч после начала ферментации вносят предшественник - 5,6-диметилбензи- мидазол. Длительность ферментации составляет около 3 сут. Если не добавить 5,6-диметилбензимидазола, то вместо витамина B_{12} синтезируется фактор В (кобинамид), и не обладающий терапевтическим действием псевдовитамин B_{12}, у которого азотистым основанием служит аденин.

Поскольку витамин B_{12} сохраняется в клетках бактерий, биомассу отделяют сепарированием и извлекают из нее целевой продукт с помощью экстракции подкисленной водой (pH от 4,5 до 5,0) при температуре 85-90 °С в течение часа. Витамин B_{12} является водорастворимым витамином. Именно поэтому водный раствор стабилизируют

$NaNO_2$, получая коферментную форму витамина, которую очищают на ионообменной смоле. Затем следует кристаллизация витамина из водно-ацетонового раствора, химическая очистка и изготовление лекарственных форм из полученного продукта.

Задача 8

Иммунобиотехнология как наука и производство, с одной стороны, предлагает средства для усиления иммунной защиты организма в ответ на различные неблагоприятные факторы окружающей среды - вакцины, сыворотки, рекомбинантные интерфероны, интерлейкины и другие цитокины, с другой стороны, путем широкого применения моноклональных антител решает такие актуальные для фармации задачи, как безопасность и контроль качества лекарственных препаратов.

Выберите иммунобиопрепараты для усиления иммунного ответа:

- пассивного специфического типа воздействия;
- пассивного неспецифического типа воздействия;
- активного типа воздействия.

Прокомментируйте возможности использования моноклональных антител при решении проблемы безопасности ЛС (мониторинг ЛС).

Вариант ответа

Понятие «антиген» подразумевает определенную химическую структуру, против которой могут быть получены антитела. Антигены внешней среды поступают в организм человека с воздухом, водой, пищей, через слизистые оболочки и кожные покровы. Часть антигенов попадает в организм в виде вакцин и иммуномодулирующих ЛС (агентов). Иммуномодуляторы либо усиливают, либо ослабляют иммунный ответ организма. Иммунный ответ - сложный процесс межклеточного взаимодействия различных типов лимфоидных клеток с участием специфических гормонов, вследствие которого В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена.

Антитела, однородные по структуре и специфичности, называют моноклональными антителами.

Способы усиления иммунного ответа по типу воздействия разделяют на активные и пассивные, а также на специфические и неспецифические. Активную иммунизацию вызывают вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей, выступающих в качестве иммунобиопрепаратов. В формировании пассивного неспецифического иммунитета участвуют

интерфероны, интерлейкины. Поликлональные антитела к инфекционным агентам вызывают пассивный иммунитет и представлены различными сыворотками. Сыворотки - это всегда готовые антитела.

По способу получения вакцины делят на живые вакцины с ослабленной вирулентностью и неживые вакцины (молекулярные анатоксины - дифтерийный, столбнячный, ботулинический).

Живые вакцины могут быть как вирусного происхождения (например, для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита), так и бактерийного происхождения для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза и др.

Существуют также комбинированные вакцины (поливакцины), состоящие из нескольких моновакцин, например АКДС (дифтерийная, столбнячная, коклюшная).

Вакцина для профилактики полиомиелита является поливалентным препаратом из трех ослабленных штаммов вируса полиомиелита.

В ответ на введение вакцины в организме человека или животного вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к инактивации патогена, блокируя его пролиферацию, что не позволяет развиться заболеванию.

Задача 9

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые возможности создания эффективных ЛС.

Продемонстрируйте возможности и достоинства гидролаз при модификации таких широко применяемых антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины на основании:

• уникальных свойств гидролитических ферментов и определенных изменений в структуре данных антибиотиков, связанных с получением более эффективных аналогов;

• сравнения химического пути трансформации с биокаталитической технологией;

• производственных результатов получения этих антибиотиков как целевых продуктов.

Вариант ответа

В отличие от химической трансформации биокатализ обладает уникальной специфичностью и избирательностью действия ферментов, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях, высокой скоростью, использованием малых количеств катализа-

торов, практически полным отсутствием побочных реакций, что является несомненным преимуществом при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и т.д.). Гидролитические ферменты (гидролазы) нашли наибольшее применение в практике по следующим причинам:

гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов;

• кинетика реакций ферментативного гидролиза легко поддается количественному описанию до глубоких степеней превращения;

• гидролазы - наиболее изученные и наиболее легко управляемые ферменты;

• существует возможность оптимизации процессов по двум параметрам - концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента;

• гидролазы избирательны по типу катализируемой реакции, проявляют широкую субстратную специфичность;

• гидролазы доступны в необходимых количествах (микроорганизмы содержат значительные количества различных гидролаз).

Возможности гидролаз можно представить при модификации пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллинов и цефалоспоринов связано с изменением боковой цепи при сохранении ядра антибиотика - 6-АПК или 7-АЦК как ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов. Например, после отщепления боковой цепи биосинтетического пенициллина и последующего ацилирования ее аминогруппы можно сравнительно легко получать его «полусинтетические» аналоги. Отщепление боковой цепи и превращение в 6-АПК с помощью фермента пенициллинамидазы можно провести в одну стадию при обычных условиях и температуре 10-40 °С в водной среде, избегая многостадийности, энергоемкости и больших объемов органических растворителей при химической трансформации, расщепив при этом более устойчивую амидную связь и сохранив более лабильную связь в β-лактамном кольце пенициллина.

Таким образом, переход к биокаталитической технологии существенно упрощает процесс, увеличивает выход целевого продукта и объем производства, стабилизирует процесс, делает его экологичным и снижает себестоимость.

При получении новых полусинтетических цефалоспоринов также используют пенициллинамидазу, которая сохраняет целостность лабильного β-лактамного кольца.

Задача 10

Одна из инфекционных клиник закупила партии пенициллина и стрептомицина. Через некоторое время в аптеку пришли представители клиники с жалобой на отсутствие терапевтического эффекта почти у всех больных клиники. После проверки в лаборатории было установлено, что препараты не фальсифицированы и соответствуют качеству стандартной продукции.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

• возможных механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов и генетических аспектов явления «инфекционной резистентности» или «госпитальной инфекции»;

• возможных механизмов индукции β-лактамаз (PBPs-2 и PBPs-3) и их ингибирования;

• разрешения данной ситуации.

Вариант ответа

Причины появления изоферментов с β-лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, т.е. в «структурном» гене. Происходит расщепление β-лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. Особенно опасны плазмидные (внехромосомные) мутации. Плазмиды - генетические элементы микробной клетки, представляющие собой кольцевые молекулы ДНК размером в сотни раз меньшим, чем размер хромосомы. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане выражается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (аналог полового процесса), т.е. без деления клетки, однако плазмида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может очень быстро передать резистентность огромному количеству клеток. Этому активно способствует и то, что некоторые типы плазмид существуют в клетке в виде нескольких единиц, а иногда и десятков копий (многокопийны). Возник даже термин «инфекционная резистентность» - «заражение резистентностью» одних клеток от других. Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы

несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Такие полирезистентные штаммы возбудителей инфекции представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда к тем антибиотикам, которые используют в инфекционной клинике на тот момент, возникает устойчивая резистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний, и соответственно антибиотик теряет свою активность.

На лечебных (терапевтических) свойствах β-лактамных антибиотиках отражается степень сродства различных β-лактамов к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin bounding proteins): PBP-1, PBP-2, PBP-3 и т.д.

В этом неодинаковом (различном) сродстве заложен сам антибиотический эффект, его продолжительность, переносимость определенными категориями больных.

Так, если в рекомендациях по применению присутствует информация о том, что новый антибиотик связывается с PBP-2, то это означает, что клетка микроорганизма будет активно лизироваться, и освобождающиеся полисахариды в большом количестве начнут поступать в кровь, вызывая у больного кратковременный пирогенный эффект. Такие антибиотики рекомендуют больным с невысоким уровнем иммунитета (например, больным СПИДом). Если есть информация о связывании с PBP-3, то это означает, что в результате действия такого антибиотика бактериальная клетка только перестает делиться, оставаясь живой, и при отмене антибиотика начинает свое деление с большей активностью и опасностью возникновения новой инфекции. Такие антибиотики можно рекомендовать только больным с сильным иммунитетом. Разрешение данной ситуации заключается в том, что информационные материалы по механизму действия антибиотика обязательно должны принимать во внимание лечащие врачи и фармацевты.

Задача 11

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина[p] на основе анализа табличных данных (табл. 16), охарактеризуйте процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Chemap 1». Состав среды, %:

- крахмал картофельный - 6,5;
- соевая мука - 1,7;
- глюкоза - 1,5;
- $(NH_4)_2SO_4$ - 0,4;
- K_2HPO_4 - 0,01;
- $CaCO_3$ - 0,5;
- pH перед посевом - 7,1.

Таблица 16. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemap 1» с использованием крахмальной среды

№ пробы	Часы роста	Биомасса, %	pH	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	PO_2	Активность, мкг/мл
1	0	–	7,1	6,55	1,56	86,8	65	50
2	11	5	6,9	6,22	1,56	86,8	60	175
3	35	10	6,9	5,98	0	84,0	57	277
4	59	38	6,5	5,36	–	81,2	52	306,6
5	83	32	7,0	4,31	–	53,2	43	297,3
6	107	30	8,2	4,31	–	89,6	43	146

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющий произвести максимальное количество антибиотика.

Вариант ответа

• Продолжительность лаг-фазы от 1 до 10 ч, утилизация субстрата слабая, дыхание снижено, биомасса растет слабо.

• Прирост биомассы максимальный на 59 ч роста от начала процесса и характеризуется снижением pH; по азоту - снижение, по углеводам - снижение, низкая интенсивность дыхания.

• Начало синтеза антибиотика совпадает со снижением показателей углеводов, азота. Скорость роста биомассы снижается.

• Торможение прироста биомассы (после 59 ч от начала процесса) совпадает с интенсификацией биосинтеза антибиотика.

В данном процессе необходимо учитывать:

• исчерпание компонентов среды с учетом скорости их потребления; в процессе ферментации остались практически неиспользованными азот и углеводы; зависимость биомассы от активности продуцента (удельная активность) минимальная;

• влияние параметров на окончание процесса; истощения среды нет, но есть автолиз, параметры процесса не сбалансированы, наблюдается защелачивание среды и снижение активности биосинтеза антибиотика;

возможность продления активной фазы процесса для увеличения выхода антибиотика. Для этого необходимо увеличить массообмен клеток и усилить их дыхание, это можно сделать, если увеличить число оборотов мешалки ферментера, усилить барботаж и аэрацию в целом.

Задача 12

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина*[8] на основе анализа табличных данных (табл. 17) и охарактеризуйте этот процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Chemap 2».

Состав среды, %:

- гороховая мука - 3;
- сахароза - 7;
- NaCL - 0,4;
- KCL - 0,04;
- K_2HPO_4 - 0,08;
- (NH4)2SO4 - 0,4;
- $CaCO_3$ - 0,8;
- pH перед посевом - 7,41.

Таблица 17. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemap 2» с использованием сахарозно-гороховой муки

№ пробы	Часы роста	pH	Биомасса, %	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	PO_2	Активность, мкг/мл
1	0	7,15	0	5,57	0,88	114,8	65	50,7
2	11	7,07	5	5,54	–	112	30	160,6
3	35	6,7	25	4,0	–	81,2	22	335,8
4	59	6,75	25	3,41	–	28	20	552,8
5	83	6,75	25	2,32	–	8,4	20	685,8
6	107	6,6	25	0,9	–	1,02	25	823

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющий произвести максимальное количество антибиотика.

Вариант ответа

- Продолжительность лаг-фазы составляет 1-10 ч, в этот период наблюдают слабую утилизацию субстрата, биомасса растет слабо. Это фаза адаптации.

- Прирост биомассы максимальный на 35 ч роста. Трофофаза (фаза роста) продолжается до 35-го часа от начала процесса и характеризуется снижением значения pH, снижением содержания азота, снижением содержания углеводов. В этой фазе происходит активное потребление всех компонентов среды, процесс интенсивный, кривые более крутые.

- Начало синтеза антибиотика совпадает со снижением показателей потребления углеводов и азота, скорость роста биомассы замедляется.

Торможение прироста биомассы совпадает с интенсификацией биосинтеза антибиотика. Максимальная скорость биосинтеза совпадает с началом стационарной кривой по биомассе.

В данном процессе можно выделить следующие особенности:

• компоненты среды почти полностью исчерпаны;

• процесс имеет высокую удельную активность биосинтеза антибиотика;

• оптимальное влияние параметров на окончание процесса;

• в целях увеличения выхода антибиотика и повышения рентабельности процесса можно продлить время ферментации, применяя азотно-углеводную подпитку.

Задача 13

Биотехнология как наука и производство основана на использовании определенных агентов и процессов для воздействия на живую природу с целью получения ценных продуктов, в том числе и ЛС.

В части анализа роли биотехнологии для современной фармации:

• сравните, что отличает современную биотехнологию в ее историческом развитии; приведите схему биотехнологического производства;

• расшифруйте, что понимают под терминами «агенты» и «процессы» в биотехнологии;

• представьте на конкретных примерах возможности воздействия на живую природу для получения ЛС.

Вариант ответа

Современная биотехнология решает многие проблемы в части фармации по созданию новых эффективных и безопасных ЛС, профилактических препаратов и различных диагностикумов. Значительная часть фармацевтической продукции сегодня полностью или частично относится именно к биотехнологическому производству. Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов, в силу объективных причин имеет тенденцию к своему расширению. В категорию лекарственных препаратов биотехнологического производства входят:

• собственно ЛС - аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;

• профилактические средства - вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы,

нормофлоры;

• диагностические средства - ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

В современном представлении «биотехнология» - это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также для промышленного получения полезных для человека продуктов, в том числе ЛС.

Биотехнология позволяет организовать не только рентабельное, экологичное, стабильное и качественное производство ЛС, но и развивать науку на самых ее передовых рубежах: это геномика и протеомика, сигнально-коммуникативные системы, антисмысловые олигонуклеотиды и т.д.

В историческом аспекте биотехнология прошла три этапа: эмпирический, научный (родоначальник - Л. Пастер), современный.

Под термином «агенты» понимают биообъекты как продуценты (источник ЛС) и ферменты (биокатализаторы). Процессы означают продуцирование (биосинтез) либо биотрансформацию (биокатализ). В качестве примера биообъектов-продуцентов можно привести грибы (эукариоты), актиномицеты и бактерии (прокариоты); в качестве примера промышленного биокатализатора - аминоацилазу, используемую при получении 6-АПК как основы для создания полусинтетических антибиотиков (метициллина, карбенициллина, оксациллина[р] и т.д.).

Схема биотехнологического производства включает:

• исходное сырье, энергетические ресурсы, квалифицированный труд;

• биообъект (продуцент, фермент);

• ферментер (биореактор);

• ферментация (биокаталитическая реакция);

• БАВ;

• побочные продукты, отходы производства.

Примеры биообъектов и их целевых антибиотических продуктов:

грибы-продуценты β-лактамов;

• *Penicillium chrysogenum* - пенициллины;

• *Acremonium chrysogenum* - цефалоспорины;

• актиномицеты, *Streptomyces* - аминогликозиды;

• бактерии *Bacillus Micromonospora polymyxa* - полимиксин;

• *Bacillus brevis* - грамицидин и т.д.

Задача 14

Существуют вполне определенные требования и условия для создания и развития биотехнологического производства ЛС. В частности, это касается проблемы выбора биообъектов для масштабирования производства. Имеются существенные различия между диким штаммом и промышленным штаммом. Штамм обладает вполне конкретными свойствами природного характера, а производственный процесс имеет свои требования к этому штамму. Существуют способы воздействия на дикий штамм с целью удовлетворения требований производства ЛС.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

• представления о биообъекте и его функциях;

• соответствия свойств продуцента требованиям производства ЛС и проблемы безопасности при работе с продуцентами;

• применения конкретных методов преобразования биообъекта для дальнейшего использования его в создании новых продуцентов ЛС.

Вариант ответа

Из определения биотехнологии следует, что основным инструментом получения или модификации ЛС является биообъект. Именно поэтому биообъект это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо фермент, катализирующий присущую ему реакцию. Для использования активно функционирующего биообъекта необходимо

знать его свойства с целью его совершенствования. Все биообъекты можно подразделить на:

• макрообъекты (человек, млекопитающие, рептилии, рыбы, насекомые, растения);

• микрообъекты (эукариоты - низшие грибы, водоросли, кроме нитчатых; прокариоты - актиномицеты, бактерии, сине-зеленые водоросли);

микробиосистемы (ферменты, протопласты).

Выбор биообъекта зависит от его конкретных свойств, таких, как безвредность, устойчивость к фагам и вирусам, активность биосинтеза, скорость роста и накопление биомассы, стабильность по производительности, чувствительность к условиям культивирования (аэрация, pH, температура), потребность в источниках углеводов и азота, использование дешевых и доступных питательных сред, соответствие условиям промышленного производства (отсутствие неприятного запаха, невысокая вязкость среды).

Повышение биосинтетической активности биообъекта возможно прежде всего благодаря использованию методов мутагенеза и селекции. Методы современной селекции

сочетаются с применением генной инженерии, которая манипулирует ДНК, изменяя либо число и порядок расположения генов, либо проводя внутригенные изменения. Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии (обратное мутирование). Типы мутаций: делеция, дупликация, амплификация и др.

Проблема безопасности в работе с продуцентами на физическом уровне предполагает понижение давления внутри ферментера для предотвращения возможного выброса культуральной жидкости во внешнюю среду. На биологическом уровне это прежде всего неукоснительное соблюдение правил GMP, одновременно можно, например, сделать биообъект «капризным» в отношении компонентов питательной среды, тогда во внешней среде без них он существовать не сможет.

Задача 15

Как известно, при использовании клеточной инженерии при создании новых продуцентов широко применяют методику протопластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

схему получения протопластов и гибридных структур;

- условия сохранения протопластов;
- конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.

Вариант ответа

Одним из способов модификации биообъекта с целью усиления его функциональной активности является метод клеточной инженерии.

Клеточная инженерия - это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и участками и целыми хромосомами у эукариот независимо от степени эволюции.

Для получения гибридных клеток применяют технику протопластирования, которая включает следующие этапы:

- выбор биообъектов (прокариот, эукариот);
- обработку клеточных стенок ферментами;
- стабилизацию протопластов (10% гипертонический раствор маннита, сахарозы, хлорида натрия);
- слияние протопластов в среде ПЭГ; для облегчения фузии клетки обрабатывают солями металлов, ферментами или быстро меняют температуру, т.е. делают их компетентными;

при слиянии (фузии) получается протопласт с двумя наборами хромосом - диплоидный набор (рекомбинация ДНК);

• регенерацию (восстановление стенки протопласта). Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду. Чтобы

отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо на 4-й стадии включить еще один протопласт, несущий маркер. Маркер - это участок гена, кодирующий образование какого-либо фермента, который «заявляет» о себе при высеве на питательную среду. Например, маркер β-лактамаза. Если в питательной среде находится бензилпенициллин, то вырастут только клетки, содержащие β-лактамазу, а это могут быть только клетки-гибриды. При протопластировании и слиянии протопластов может происходить явление амплификации (увеличения) количества генов. Например, если амплифицируется ген, ответственный за синтез целевого продукта, то выход последнего (витамины, гормоны, антибиотики) соответственно увеличивается.

Задача 16

В современной биотехнологии при создании ЛС особое место отводится генной инженерии, суть технологии которой заключается

в искусственном соединении отдельных фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку с целью получения рекомбинантных белков. Для осуществления этого необходимы определенные условия, наличие транспортного устройства для внесения ДНК в клетку продуцента, использование ферментов для включения нового гена. Генная инженерия оперирует такими понятиями, как вектор, рестриктазы, липкие концы, сайт узнавания, лигазы, ген-маркер, компетентность клетки, экзон, интрон.

С представленных общих позиций по генной инженерии сформулируйте конкретные условия:

• расшифруйте понятие «вектор» и пути его введения в клетку; предложите ферменты, работающие в этой ситуации;

• предложите технику генно-инженерного эксперимента (стадии);

• сравните процесс образования мРНК у эукариот и прокариот.

Вариант ответа

Цели генной инженерии - создание новых продуцентов целевых продуктов (новые ЛС, диагностические и профилактические препараты).

Суть технологии - соединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку посредством ферментов эндонуклеаз, в частности рестриктаз.

Техника генно-инженерного эксперимента.

• Получение чужеродного фрагмента ДНК для последующей вставки его в клетку хозяина.

• Выделение плазмиды из клетки-донора (например, *E.* сой).

• Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора). Векторрекомбинант (плазмида в виде фага или изолированной ДНК, или вируса) получают с помощью фермента рестриктазы, разрезающей фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи (сайт узнавания). При этом образуется два липких конца. Далее следует стадия отжига - процесс смещения двух фрагментов ДНК, при котором восстанавливаются только водородные связи. Для восстановления фосфодиэфирных связей используют ферменты ДНК-лигазы, которые «сшивают, склеивают» молекулы ДНК.

Включение вектора в клетку хозяина. Вектор включается в клетку хозяина при условии, если цитоплазматическая мембрана близко подходит к клеточной стенке, тогда вектор проникает внутрь клетки через так называемые окошечки, которые образуются при

обработке ее ферментами, в результате чего эта клетка становится компетентной.

• Отбор гибридных клонов. Проводят посев на питательную среду, содержащую, например, антибиотик бензилпенициллин. При этом вырастают только клоны, имеющие в своем геноме генмаркер, кодирующий синтез, например, фермента β-лактамазы. Ген-маркер заранее внедряется в геном гибридной плазмиды.

В процессе образования молекулы мРНК имеет место процесс сплайсинга (сращивания). У эукариот, в отличие от прокариот, ген представляет собой мозаичную структуру, содержащую наряду с экзонами (последовательности оснований, несущие информацию) интроны (последовательности оснований, не несущие информацию). Однако фермент РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзонов, так и интронов. В процессе сплайсинга у эукариот интроны с помощью ферментов вырезаются, а экзоны после удаления интронов сращиваются. При этом образуется функционирующая (зрелая) мРНК. У прокариот нет такого процесса (так как их гены не содержат интроны), и образующаяся в результате транскрипции молекула мРНК сразу же способна к функционированию.

Задача 17

Возникновение таких новых дисциплин, как геномика и протеомика, является настоящим прорывом в биологии и имеет большое значение при создании новых, более эффективных ЛС. Если геномика обозначает совокупность всех генов организма, то протеомика подразумевает совокупность всех каталитических и структурных белков в клетке эукариота или прокариота. Задача геномики - полная генетическая характеристика именно всей клетки. Геномика позволяет выразить сущность организма, его видовые и индивидуальные отличия, предвидеть реакцию на внешние воздействия. Геномика имеет

свою классификацию, открывает новые возможности для генотерапии, создания нетрадиционных ЛС, таких, как антисмысловые олигонуклеотиды.

В свете представленной краткой информации приведите:

- классификацию геномики с обозначением соответствующих задач;
- возможности генотерапии;
- ситуации возможного применения антисмысловых олигонуклеотидов.

Вариант ответа

Согласно целям и задачам различают структурную, сравнительную и функциональную геномику.Структурная геномика занимается идентификацией геномов клеток и отдельных структурных генов по определенным характеристикам: общее количество генов в геноме и их последовательность, молекулярная масса, нуклеотидная последовательность в каждом гене. Эти характеристики относятся к геному-хромосоме у прокариот и к каждой из хромосом у эукариот. Сравнительная геномика получает сведения о степени гомологии родственных генов, что позволяет ответить на вопрос об эволюционной близости одного организма другому. Она также позволяет вести поиск ингибиторов какоголибо гена (вернее, кодируемого им белкового продукта) у патогенного микроорганизма с целью создания на их основе ЛС, однако при этом необходимо знать, есть ли ген с такой или близкой последовательностью нуклеотидов в организме хозяина. Таким путем можно определять также степень безопасности ЛС. Функциональная или метаболическая геномика устанавливает связь между геномом и метаболизмом, кластерами генов и многоступенчатыми метаболическими процессами, отдельными генами и конкретными метаболическими реакциями (в этом случае имеются свои специализированные базы данных).

Практическим применением достижений геномики является генотерапия. Для реализации возможностей генотерапии требуется предварительное создание рекомбинантной генетической конструкции с нормальной копией дефектного гена, а также создания для этой конструкции вектора, переносящего ее в клетки организма пациента. Векторы строятся на основе ретровирусов или аденовирусов и их генетических модификаций с тем условием, чтобы при сохранении способности проникать в клетку они теряли бы способность к автономной репликации. Современная генотерапия направлена только на соматические клетки. Генотерапия *ex vivo* предполагает введение путем трансфузии или трансплантации исправленных копий дефектного гена, предварительно извлеченных из клеток организма пациента. В этом случае снимается проблема отторжения клеток и необходимость проведения терапии иммуносупрессорами. При генотерапии *in vivo* осуществляется доставка в ткани пациента нормального, но выделенного из клеток другого организма гена (чужеродного).

Антисмысловые олигонуклеотиды - ЛС XXI века, представляющие собой комплементарную для определенного участка гена последовательность нуклеотидов (длиной 15-20 нуклеотидов), которая за

счет водородных связей будет реагировать или с ДНК гена, или с его иРНК, матрицей для которой служит вышеуказанная ДНК. Такие ЛС могут использоваться в случае гиперпродукции нормального функционально активного белка, что является причиной некоторых как наследственных, так и ненаследственных заболеваний.

Подавление образования избыточного белка в случае применения антисмысловых олигонуклеотидов будет происходить либо на стадии транскрипции (реакция с ДНК), либо на стадии трансляции (реакция с иРНК). В качестве защиты от эндонуклеаз клетки предлагают «упаковку» таких нуклеотидов в липосомы.

Задача 18

Современный скрининг ЛС предполагает получение новых ЛС, более эффективных и безопасных. Скрининг как метод предполагает поиск и отбор продуцентов, с помощью которых можно получать новые ЛС с достаточной степенью функциональной активности, определяемой по биологическим тестам с дальнейшей расшифровкой химической структуры и механизма действия. Скрининг можно проводить в классическом варианте или на генном уровне.

Проанализируйте последние достижения геномики и протеомики, помогающие в решении проблем поиска новых эффективных и безопасных ЛС. В ответе используйте:

- современные данные о последних достижениях геномики и протеомики;
- понятие таргетного скрининга;
- международные программы поиска ivi-генов.

Вариант ответа

Успехи молекулярной биологии в развитии таких направлений, как геномика и протеомика, позволяют исследователю при использовании соответствующих международных баз данных получать сведения о каждом гене, входящем в геном тест-объекта, получить любой ген в изолированном состоянии, копировать его с помощью ПЦР и на полученной таким образом матрице нарабатывать сначала информационную РНК (иРНК), а затем уже в бесклеточной рибосомной системе и специфический для этого гена белок. Данный белок рассматривают как таргет, т.е. мишень для оценки на молекулярном уровне потенциальных биологически активных агентов как природных, так и синтетических соединений. Используя такой метод скрининга, можно целенаправленно вести поиск ингибиторов функций

продукта конкретного гена. Таким образом, таргетный скрининг ЛС начинается не с клетки, а с конкретного гена в качестве тестобъекта. Предпочтение тому или иному гену отдают исходя из задачи (какого рода ЛС мы хотели бы получить) и с учетом данных

структурной, сравнительной и метаболической геномики. В дальнейшем отобранные таким образом БАВ должны быть испытаны на предмет клеточной проницаемости, достижения мишени, токсичности и т.д. В качестве частного случая можно указать на перспективность использования таргетного скрининга при поиске «молчащих» или скрытых генов вирулентности (ivi-генов). С учетом проблемы обнаружения этих генов *in vitro* используют метод так называемого захвата чужого промотора (IVET). Суть метода представлена ниже.

• Геном патогенной бактерии «режется» рестриктазами на сотни фрагментов $x_1,x_2,x_3...x_n$.

• Каждый фрагмент соединяется с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы: x_1-cat, x_2-*cat* ... x_n-cat.

• Далее к этой генно-инженерной конструкции присоединяется лишенный промотора лактозный оперон: *x-cat-lac Z... x_n-cat-lac Z.* Представленная комбинация включается в плазмиду. Получается набор плазмид, различающихся только по фрагменту «х» генома сальмонеллы.

• Наборы плазмид вводят в клетку *E. coli* и получается ряд различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы.

• Производят внедрение *E. coli* в организм лабораторного животного (мыши) с одновременным введением ей хлорамфеникола.

• Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.

• Анализ колоний. Красные колонии (90%) и бесцветные колонии (10%). Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит на искусственной питательной среде данный промотор (промотор лактозного оперона) не работал, и ген во фрагментах $x_1,x_2,x_3...x_n$ не экспрессировался. Именно здесь и нужно искать ivi-гены, т.е. гены вирулентности.

Задача 19

Развитие резистентности сегодня является настолько серьезной проблемой лекарственной терапии, что грозит вернуть человечество к «доантибиотической эре». Особенно опасна в этом смысле плазмидная резистентность. Известно, что плазмида как внехромосомный фактор наследственности способна самостоятельно реплицироваться

в клетке независимо от процесса ее деления. Плазмида - носитель генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды могут содержать гены резистентности к различным антибиотикам, которые легко передаются из клетки в клетку при конъюгации. Гены β-лактамаз, особенно цефалоспориназ, могут локализоваться также и в бактериальной хромосоме. Резистентность может существовать и за счет генов клетки, делающих мембрану непроницаемой для антибиотиков. *В свете обозначенной проблемы представьте:*

• схему развития плазмидной резистентности и первоисточник генов резистентности;

• способы преодоления резистентности;

• различие хромосомной и плазмидной локализации структурных генов β-лактамаз;

• роль конъюгативных транспозонов в проявлении резистентности и возникновении госпитальной инфекции.

Вариант ответа

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов и обусловило возникновение «генов резистентности» как в хромосоме, так и в плазмиде. Плазмиды с генами резистентности к антибиотикам получили название R-плазмид (старый термин - R-факторы). Конъюгация и репликация плазмид в большом количестве клеток с учетом их многокопийности делают возможным развитие «инфекционной резистентности», т.е. «заражения резистентностью» одних клеток другими. Причина появления изоферментов с β-лактамазной активностью состоит в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте-мишени, другими словами, в структурном гене этого фермента. Происходит расщепление β-лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность.

• варианты скрининга антибиотиков;

• методы определения антимикробной активности антибиотиков;

• сравнение с антисептиками (использование, достигаемые цели, механизм действия).

Вариант ответа

Скрининг (поиск и отбор) продуцентов антибиотиков может быть ненаправленным (первичным), когда отбирают наиболее активные микроорганизмы-продуценты по способности продуцировать антибиотики или другие БАВ. Направленный скрининг - поиск и отбор продуцентов антибиотиков определенного химического строения или с определенным механизмом антагонистического действия.

Схема скрининга:

• приготовление стерильных питательных сред;

• приготовление почвенной суспензии;

• посев на агаризованную среду;

• выделение микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в виде чистых культур;

• хранение микроорганизмов-продуцентов и оценка их способности продуцировать антибиотики.

Образцы почв с большим разведением высевают на твердые питательные среды в чашках Петри, чтобы получить фактически из одной клетки штамм почвенных микроорганизмов (штамм - это культура, выросшая из одной клетки). Далее определяют физиологические параметры штамма, его антибиотическую активность, которую оценивают по зоне отсутствия роста на твердых питательных средах тех или иных бактерий вокруг посеянного штриховым способом изучаемого штамма, или по зоне отсутствия роста вокруг лунки в агаре, или же вокруг впаянного в агар металлического цилиндра (без дна), заполненного культуральной жидкостью исследуемого штамма. Существует два варианта определения антибиотической активности на основе метода диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов, образующихся при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата:

трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов;

• однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм или ставят цилиндрики, в которые вносят пипетками опытные растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл; чашки термостатируют 18 ч при 37 °С.

Расчет активности производят в соответствии с ГФ (издание XI, вып. 2, 1990 г., с. 210).

При сравнении антибиотиков с антисептиками прежде всего необходимо отметить избирательность действия первых на метаболизм (из нескольких тысяч реакций они подавляют одну или несколько). Кроме того, антибиотики высокоактивны и угнетают рост микроорганизмов в концентрации порядка 1 мкг/мл или меньше.

Задача 21

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых плесневыми грибами и объединенных под общим названием «β-лактамные антибиотики» (пенициллины и цефалоспорины), достаточно широко представлена на фармацевтическом рынке.

Проведите анализ β-лактамных антибиотиков с точки зрения:

• продуцентов, химической структуры и биологической активности;

• биологической роли антибиотиков для продуцентов и механизмов защиты продуцентов от антибиотиков;

• механизма биосинтеза и механизма действия на бактериальную клетку.

Вариант ответа

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых грибами (пенициллины и цефалоспорины), объединена под общим названием β-лактамных антибиотиков. Основной частью химической структуры, определяющей их антимикробную активность, является четырехчленное β-лактамное кольцо (циклический амид). При образовании β-лактамного

кольца замыкается связь между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы при β-углеродном атоме.

Плесневые грибы как продуценты β-лактамных антибиотиков относятся к многочисленным почвенным микроорганизмамэукариотам, имеющим окруженное мембраной ядро. У них также присутствуют субклеточные структуры - митохондрии с ферментами, катализирующими биоэнергетические процессы. Клеточная стенка состоит из хитина с остатками аминосахаров. Клетки плесневых грибов формируют различные виды мицелия и отличаются от бактериальных клеток более сложной организацией, большими размерами и длительным циклом развития (6-7 сут).

β-Лактамные антибиотики образуются двумя родами плесневых грибов: *Penicillium* (пенициллины) и*Cephalosporium* (цефалоспорины) или *Acremonium*. Широко известны два продуцента β-лактамов: *Penicillium chrysogenium* и *Acremonium chrysogenium*. Первый образует бензилпенициллин, второй - цефалоспорин C^p. У пенициллинов с β-лактамным кольцом сконденсировано пятичленное кольцо, а у цефалоспоринов - шестичленное.

Предназначение антибиотиков в почвенных биоценозах: средства выживания в борьбе за питательные вещества и т.п., антистрессорные средства, эффекторы образования мицелия или спорообразования.

Механизм действия β-лактамных антибиотиков на бактериальную клетку заключается в их способности ингибировать синтез пептидогликана клеточной стенки на последнем этапе, подавляя активность фермента транспептидазы, который соединяет концы пептидных цепочек. β-Лактамный антибиотик связывается с активным центром фермента, инактивируя его. В этом случае пептидные цепочки не замыкаются. В результате клетка или лизируется, или переходит в спорообразование.

Механизм биосинтеза. Предшественники β-лактамных антибиотиков - аминокислоты, которые в результате ферментативных реакций преобразуются в β-лактамную структуру. Началом формиро-

вания β-лактамной структуры считают синтез LLD-трипептида из трех L-аминокислот: L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина. В образовании LLD-трипептида участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи и ферменты, превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин. Затем LLD- трипептид превращается в моноциклический β-лактам. Следующий этап - появление серосодержащего пятичленного кольца, сконденсированного с β-лактамным. Далее ферментативные реакции с образованием бензилпенициллина или цефалоспорина C^p. В первом случае в реакцию вступает ФУК и образуется бензилпенициллин, освобождается аминоадипиновая кислота и кофермент А. Во втором случае происходит «экспансия», расширение пятичленного кольца в шестичленное, катализируемое ферментом «экспандазой», после чего формируется молекула цефалоспорина C^p.

Задача 22

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества антибиотиков. Ряд представителей родов*Streptomyces* и *Micromonospora* образуют антибиотики аминогликозидной структуры. Кроме природных аминогликозидов, в медицинской практике используют также синтетические аминогликозидные антибиотики.

Проанализируйте аминогликозидные антибиотики, исходя из:

• их сравнительной характеристики в соответствии со структурой, биологической активностью и практическим применением;

• отличия актиномицетов от бактерий и грибов;

• механизма действия, выделяя при этом наиболее токсичные структуры.

Вариант ответа

Особенность актиномицетов заключается в том, что они в эволюционном отношении ближе к бактериям (прокариотам), чем к грибам, хотя являются многоклеточными организмами и имеют сложный цикл развития (5-6 сут). Однако их геном не заключен в ядро и представляет собой кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной; не содержат они и митохондрий. Клеточная стенка актиномицетов состоит из гетерополимера - пептидогликана.

В молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют остаток шестичленного аминоциклитола и остатки сахаров или аминосахаров. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora,*

образуют природные антибиотики: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и др. с широким спектром антибактериального действия. Кроме природных, в клинической практике используют также и полусинтетические аминогликозидные антибиотики. Например, антибиотики тетрациклиновой структуры: хлор-, окси- и тетрациклин со структурой из 4 циклов различаются только по «верхней» части, нижняя часть структуры молекулы у них одинакова. Химическая модификация верхней части тетрациклиновой структуры позволила получить полусинтетические тетрациклины - доксициклин и миноциклин (первый с пролонгированным действием, второй - с более высокой антибактериальной активностью).

Молекула антибиотиков макролидной структуры содержит макроциклическое лактонное кольцо, соединенное с сахарами и/или аминосахарами. Природные макролиды это эритромицин *(Stretomyces erythraeus)* и олеандомицин *(Streptomyces antibioticus).* Они эффективны только против грамположительных бактерий (антибиотики узкого спектра действия). Антибиотики сложной анзамициновой структуры*(Streptomyces mediterranei)* с нафталиновым ядром и длинной алифатической цепью, соединенной с ароматической частью эфирной и амидной связью, представлены полусинтетическим антибиотиком рифампицином (применяют при лечении туберкулеза). Представители рода *Streptomyces (Streptomyces nourasei)* образуют полиеновые антибиотики (полиеновые макролиды). У них макроциклическое лактонное кольцо содержит ряд сопряженных двойных связей. К

этим антибиотикам относятся нистатин (тетраен-диен) и амфотерицин В (гептаен). В их молекуле присутствуют также аминосахара. Это антигрибковые препараты, которые являются достаточно токсичными, и поэтому их используют в основном для наружного применения. Актиномицеты образуют и противоопухолевые антибиотики: блеомицин - гликопептид*(Streptomyces verticillius).* Антрациклины (дауномицин[р], адриамицин[♠]) имеют структуру, сходную с тетрациклинами, но ни по спектру антибиотического действия, ни по применению в клинической практике они не похожи. Механизм действия аминогликозидов - ингибирование синтеза белка у бактерий посредством связи с малой рибосомной субъединицей. При этом нарушается правильность считывания кодонов иРНК антикодонами тРНК.

Задача 23

Весьма существенную роль для продвижения антибиотика в производственную сферу играет возможность проведения сравнительной

идентификации антибиотика на начальных этапах исследования в части их функциональной активности как антибактериальных ЛС. *В условиях поставленной задачи предложите:*

• методы и варианты проведения сравнительной идентификации, оценку антимикробной активности антибиотика;

• способы выделения антибиотика из культуральной жидкости;

• проведение количественной оценки.

Вариант ответа

Существуют два варианта определения антимикробной активности по методу диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата.

Трехдозный, когда для проведения анализа готовят по три концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов.

Однодозный с использованием стандартной кривой в полулогарифмической сетке. В чашках Петри с тест-организмом вырезают лунки диаметром 8 мм или ставят цилиндрики, в которые вносят пипетками опытные растворы и стандартные образцы в объеме 0,05 мл. Чашки термостатируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Расчет антимикробной активности при использовании этих вариантов осуществляют в соответствии с Государственной фармакопеей.

Способы выделения антибиотика зависят от его локализации. Это может быть и культуральная жидкость, и мицелий или и то, и другое вместе.

Если антибиотик находится в мицелии, его стремятся перевести в водную фазу, меняя, к примеру, pH культуральной жидкости (например, в случае тетрациклинов).

Кроме того, можно объединить растворенный антибиотик в общем осадке, из которого его затем экстрагировать. Экстракцию применяют при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин. Один из примеров при экстракционном методе выделения и очистки - извлечение пенициллина из бутилацетата, где он находится в виде свободной кислоты. При добавлении ацетата калия образуется калиевая соль пенициллина, кристаллы которого промывают бутанолом и высушивают.

Обработка культуральной жидкости включает различные способы коагуляции, флокуляции,

так как она содержит не только антибиотик, но и мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонен-

тов питательной среды: высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли.

Отделение нативного раствора от мицелия и коллоидных частиц осуществляют методами фильтрации и центрифугирования с использованием барабанных вакуум-фильтров, пресс-фильтров, сепараторов. В очистке антибиотиков широко применяют ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое место занимают сорбционные методы при получении аминогликозидов в высокоочищенном виде (в частности, стрептомицина).

Помимо традиционных методов очистки антибиотиков существует также мембранная технология для разделения сложных смесей. Для количественной оценки используют практически все традиционные физико-химические методы анализа. Это титриметрические, оптические, хроматографические (особенно ВЭЖХ) методы. При обезвоживании препаратов антибиотиков используют либо лиофильную сушку (замороженного стерильного раствора, разлитого во флаконы в вакууме), либо распылительную сушку. Все серии лекарственных форм контролируют в соответствии с Государственной фармакопеей или соответствующими производственными регламентами с учетом требований международных фармакопей.

Задача 24

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам этого производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации используйте:

• технологическую схему производства с разделением ее на подготовительную и основную части и их краткой характеристикой;

лассификацию биосинтеза по технологическим параметрам;

• реализацию системного подхода в зависимости от цели и поставленной задачи с выбором типа ферментационного процесса.

Вариант ответа

Биотехнологическое производство ЛС и БАВ строится на использовании исходного сырья, энергетики, реализованного труда, биообъектов, процессов и аппаратов. В условиях такого производства технология делится на ряд подготовительных и основных этапов.

К числу подготовительных этапов относятся:

• выращивание посевной среды (инокулята) сначала в пробирках, затем в колбах на качалках с последующим перемещением ее в инокулятор и далее в ферментер;

• подготовка питательной среды;

• подготовка ферментационного оборудования.

Основные операции (стадии): биосинтез, разделение биомассы и культуральной жидкости, концентрирование, очистка (ультрафильтрация, экстракция, сорбция), получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы с последующей расфасовкой и упаковкой.

Процессы ферментации (биосинтеза) можно классифицировать по технологическим параметрам, например по организации материальных потоков. Процессы представлены ниже.

• Периодический (задаются и остаются без изменений все параметры ферментации - температура, pH, обороты мешалки). Этот процесс - нерегулируемый и используется, например, при выращивании пропионовых бактерий для получения витамина B_{12} в анаэробных условиях на специально подобранной среде или в случае получения биомассы как целевого продукта.

• Полупериодический (регулируемая ферментация). В ходе процесса добавляют питательные вещества, регулируют pH, в случае необходимости добавляют предшественники. Пример: при получении вторичных метаболитов антибиотиков (при биосинтезе пенициллина на 2, 3 сут необходимо добавить ФУК).

Непрерывный процесс. В процессе биосинтеза отбирают небольшую часть культуральной жидкости (10-15%) и переносят в другой ферментер. Культуральная жидкость выполняет роль посевного материала. В первый ферментер добавляют равное количество питательной среды или воды. Получается замкнутый цикл. Например, совершенствование стадии получения сорбозы (для повышения выхода целевого продукта) при синтезе аскорбиновой кислоты при переходе от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному позволило увеличить скорость образования сорбозы в 1,7 раза.

• Многоциклический процесс отличается тем, что в конце ферментации 90% культуральной жидкости сливают из ферментера, а оставшаяся часть выполняет роль посевного материала.

В двух последних случаях отпадает необходимость в стадии выращивания посевной среды.

При выборе типа ферментации в зависимости от поставленной задачи имеет существенное значение, что является целевым продуктом: первичные или вторичные метаболиты. Критерием в выборе типа ферментации (поверхностная или глубинная) служат также объемы производства. Если это промышленное производство, то, безусловно, это глубинная ферментация, а если нужны небольшие объемы, к примеру, в лабораторных условиях, то это поверхностная ферментация (биологические матрасы).

Задача 25

Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

В условиях поставленной задачи укажите:

• в чем выражается многостадийность биосинтеза;

• способы предотвращения контаминации целевого продукта;

• схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.

Вариант ответа

Многостадийность биосинтеза выражается в выращивании посевной среды (многоэтапность), в приготовлении соответствующей питательной среды многокомпонентного состава, в самом процессе ведения биосинтеза (биокатализа), в выделении, очистке, концентрировании, сушке, фасовке и упаковке ЛС. Все эти этапы требуют стерильных условий производства, его асептики, начиная с воздуха, оборудования и заканчивая асептикой питательной и посевной среды.

Биосинтез осуществляют с использованием жидкой питательной среды, при глубинном культивировании. Емкости ферментеров имеют объем от 100 л (1 $м^3$) до 10 000 л (100 $м^3$), и все коммуникации стерилизуют острым паром (130 °С) в течение 1 ч. Стерилизацию воздуха производят методом фильтрации по следующей схеме: воздух с улицы поступает в фильтр предварительной очистки, где он очищается от пыли и влаги, затем на компрессор, где воздух нагревается, далее в холодильник для охлаждения, после чего под давлением проходит в головной фильтр (общий для цеха ферментации) и, наконец, в индивидуальный фильтр для каждого ферментера.

Поступающий с улицы воздух содержит от 1000 до 100 000 клеток микроорганизмов в 1 $м^3$, среди которых могут встречаться и патогенные

штаммы. Именно поэтому, чтобы не допустить контаминации культуральной жидкости, индивидуальные фильтры не должны пропускать микроорганизмы размером более 0,25 микрона (мкм). Для сравнения, размеры, например, кокков составляют 0,5-1,5 мкм, кишечной палочки - 0,4-0,8 мкм. При этом существует так называемый коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизация не всегда возможна.

Фильтры стерилизуют острым паром при 120-130 °С в течение 30 мин. Для проверки эффективности стерилизации проводят биологический анализ проб. Питательную среду стерилизуют с применением термического нагревания (в 1 г кукурузной муки содержится от 104 до 109 клеток микроорганизмов). К воде как компоненту питательной среды предъявляют те же требования, что и к питьевой воде (водопроводная вода должна содержать не более 100 микробных клеток в 1 мл).

Задача 26

Несмотря на то что в основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем, технологическое использование ферментов имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования, в ряде случаев наличие коферментов.

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

• путей преодоления этих ограничений;

• сопоставления функции биообъекта с технологической операцией;

• понятия «система, открытая для усложнения». *Вариант ответа*

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления вышеуказанных трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов из клеток микроорганизмов. Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы). Иными словами, иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют следующие методы иммобилизации ферментов:

• ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю (природные полимеры - целлюлоза, хитин, агароза; синтетические - поливинилхлорид, полиакриламид и др.);

• захват фермента в сетку геля или полимера;

- ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками;
- адсорбция фермента на водонерастворимом носителе (часто на ионитах);
- микрокапсулирование.

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов: их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстрата и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим с использованием проточных аппаратов или колонн с иммобилизованными ферментами.

Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы в качестве катализатора. Примеры носителей органической природы: желатин, фибрин, альгинат натрия, целлюлоза, ПААГ. Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта. Ограничения использования иммобилизации возможны в 2 случаях: если целевой продукт не выходит в среду и если у фермента есть непрочно с ним связанный кофермент, без которого этот фермент не работает.

Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Ячейки геля не должны быть слишком маленькими (иначе возникнут трудности контакта фермента с субстратом и недостаточная аэрация). Однако и слишком большого размера ячейки геля быть не должны. В этом случае связь с гелем образуется слабая, и биообъект может вымываться.

Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом. Так, например, очищенный фермент, фермент в клетке с коферментом, фермент в пермеабилизированной клетке выполняют только отдельную реакцию: одноступенчатую трансфор-

мацию. Интактная клетка (клетка-продуцент) осуществляет полный биосинтез целевого продукта посредством цепочки реакций.

Система, открытая для усложнения, - это клетка-продуцент какого-либо предшественника целевого продукта + первый фермент + второй фермент + третий фермент и т.д., т.е. биосинтез предпродукта и его биотрансформация осуществляются в одном биореакторе. Таким путем можно, в частности, одновременно получать 6-АПК, ампициллин и т.д.

Задача 27

Правила GMP - руководящий нормативный документ международного значения, который должны обязательно принимать к сведению как отдельные фирмы, так и все производство фармацевтических препаратов в целом. Это правила организации и контроля

производства, которые составляют единую систему требований к качеству выпускаемой продукции. Все производства, интегрированные в международный рынок ЛС и медицинских препаратов, выпускающие готовые лекарственные формы и любую продукцию медицинского назначения, включая субстанции, обязаны работать по этим правилам. В то же время каждая страна, производящая ЛС, имеет свою Государственную фармакопею как руководящий документ проверки качества той или иной медицинской продукции.

Проведите сравнительный анализ:

• правил GMP и государственных фармакопей с позиций требований для экспорта фармацевтической продукции;

• необходимости проведения валидации как любого фармацевтического производства, так и биотехнологической продукции в частности;

• правил международного значения для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС.

Вариант ответа

Правила GMP - правила организации производства и контроля качества ЛС, единственная система требований к производству и контролю, руководящий нормативный документ для производителей и фирм, выпускающих ЛС, для всей продукции медицинского назначения и субстанций. Самые жесткие требования предъявляют к инъекционным лекарственным препаратам. Эта система требований была введена в развитых странах в 1969 г. под эгидой ВОЗ. В последующие годы ее неоднократно пересматривали. Внедрение этой системы

приносит выгоду импортерам и имеет значительные преимущества для экспортеров, так как является гарантией высокого качества предлагаемой продукции при соблюдении определенных требований:

• обязательной государственной регистрации ЛС;

• обязательного государственного инспектирования и надзора за фармацевтическими предприятиями;

• в стране должны быть приняты правила GMP; подобно фармакопеям, правила GMP неоднородны, поэтому существуют:

- международные правила GMP (разрабатывает ВОЗ);

- региональные правила GMP (например, в странах Европейского экономического сообщества, ассоциации стран Юго-Восточной Азии);

- национальные правила GMP (внедрены в 30 странах мира).

В некоторых странах, в частности в Японии, национальные правила GMP ужесточены по сравнению с международными.

В перечне разделов правил GMP особое место занимает раздел валидации. Валидация - оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Валидация бывает периодической и внеплановой и оценивает как сам производственный процесс, так и пределы его возможностей.

На биотехнологическом производстве внеплановую валидацию проводят, если производство меняет штамм продуцента или изменена питательная среда (меняется метаболизм продуцента и возможно появление нежелательных примесей).

Для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС используют правила GLP - правила организации лабораторных исследований. Перед клиническими испытаниями проводят лабораторные исследования *(in vitro, in vivo).* При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований. Животные должны быть гетерогенны (разные виды), их питание должно быть постоянным и одинаковым; требуется определенная планировка вивария для исключения стресса у животных и поддержания их жизнеспособности.

Правила GCP - правила организации клинических испытаний с соблюдением прав больных и добровольцев, с созданием общественных и этических комитетов по контролю клинических испытаний лекарственных препаратов. Цель клинических испытаний: получение достоверных результатов по терапевтическому эффекту ЛС и

безвредности его применения на пациентах. Для исключения вероятности необъективности трактования полученных данных рекомендуют увеличивать количество учреждений, где проходят испытания, а не ограничиваться рамками одного учреждения и одним и тем же количеством испытуемых.

Задача 28

Иногда в клиниках или больницах наблюдается явление внутрибольничной инфекции, когда успешно применяемые антибиотики перестают оказывать терапевтическое действие, вызывая явление антибиотикорезистентности.

В условиях этой проблемы:

• проанализируйте ситуацию, когда гены резистентности присутствуют у почвенных микроорганизмов-продуцентов антибиотиков и могут передаваться патогенным микроорганизмам;

• сравните хромосомную и плазмидную локализацию структурных генов β-лактамаз;

• предложите пути преодоления этой резистентности на примере β-лактамов и цефалоспоринов.

Вариант ответа

Первоисточник генов резистентности - почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам. Появление у них генов резистентности также может быть обусловлено спонтанными мутациями у микроорганизмов. Вместе с тем развитие резистентности может быть связано с генами, кодирующими синтез ферментов деградации собственного антибиотика, которые способны переноситься из микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков, а формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено появлением генов резистентности как в хромосомах, так и в плазмидах. Плазмидная резистентность особенно опасна в генетическом плане, так как плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации, без деления клетки, однако плазмида при этом реплицируется. Кроме того, некоторые типы плазмид многокопийны. Отсюда термин «инфекционная резистентность», т.е. «заражение резистентностью» одних клеток от других.

- β-лактамный антибиотик имипинем (легко проникает через пориновые каналы);
- цефалоспорины, имитирующие переносчики железа;
- цефалоспорины III поколения, устойчивые к β-лактамазам (цефтазидим и др.);
- цефалоспорины IV поколения, не являющиеся индукторами β-лактамаз (цефепим, цефпиром);
- амикацин (канамицин + L-Y-амино-а-оксимасляная кислота);
- организационные мероприятия по смене антибиотиков.

Задача 29

Биотехнологические методы получения ЛС на основе культур клеток растений имеют широкое распространение, поскольку по сравнению с получением биомасс растительных культур из дикой природы или с плантаций эти методы отличаются высокой рентабельностью, экологичностью, независимостью от географии и климата произрастания того или иного растения, а также обеспечивают высокое качество целевого продукта, стабильность производства и возможность управления процессами (автоматизацию). Все вышеперечисленное указывает на высокую перспективность дальнейшего развития данных методов.

Анализируя данную ситуацию:

- представьте технологии получения лекарственных препаратов растительного происхождения с конкретными примерами, обращая внимание на специфику

растительных клеток, фазы роста, питательные среды, условия ферментации и типы биореакторов;

• сопоставьте стабильность процесса по выходу вторичных метаболитов с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (фазы роста клеток);

• предложите метод использования ферментов для превращения дигитоксина в дигоксин (последний менее токсичен и поэтому его применяют в качестве сердечного препарата - карденолида).

Вариант ответа

Метод биотехнологии получения ЛС на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани или каллуса. Каллус - ткань, возникающая при неорганизованной пролиферации клеток растения (дедифференцированное деление клеток). Метод реализует способность любой клетки образовывать полноценное растение в соответствии с ее генетическим и физиологическим потенциалом (естественными возможностями). Эта способность называется «тотипотентность». Стабильность по выходу целевого продукта (вторичных метаболитов) обычно связывают с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (конец экспоненциальной стадии с переходом на постоянную фазу роста и деления клеток).

Примером влияния дифференцировки клеток на выход целевого продукта служит дифференцированный корневой каллус *Atropa belladonna,* синтезирующий тропановые алкалоиды (в отличие от недифференцированного). Другой пример: только недифференциро-

ванные клетки *Rauwolfia serpentine* синтезируют индолиловые алкалоиды.

Технология получения каллуса требует наличия молодых и здоровых клеток, стерильности, определенной температуры (+24-26 °С) и влажности (65-70%), аэрации, соответствующего оборудования (специальные ферментеры). В питательную среду, помимо микро- и макроэлементов, источников углерода, витаминов, нужно вносить регуляторы роста растений - ауксины (индолилтриуксусная кислота и др.) и цитокинины (6-бензиламинопурин и др.). Также весьма существенную роль для синтеза метаболитов играют предшественники. Так, добавление фенилаланина увеличивает выход диосгенина

на 100%.

Накопление вторичных метаболитов зависит от того, на каких средах (жидких или твердых) проводят культивирование.

Суспензионное культивирование осуществляют в аэрлифтных ферментерах без механической мешалки (с турбинным перемешиванием, с внешней циркуляционной петлей). Растительные клетки в отличие от клеток микроорганизмов имеют большие размеры, вакуоль, целлюлозную клеточную оболочку, клеточные агрегаты. Все это требует системы перемешивания восходящими потоками воздуха (встряхиванием без

механических повреждений). Как правило, для этого используют следующие режимы культивирования: периодический (чаще), циклический и непрерывный (нарастание биомассы коррелирует с синтезом вторичных метаболитов). Для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применяют иммобилизацию растительных клеток.

Иногда конечный продукт биосинтеза необходимо частично преобразовать. В этом случае применяют биотрансформацию - метод, использующий ферменты клеток растения, способные менять функциональные группы добавленных извне химических соединений. Примером применения биотрансформации служит превращение дигитоксина в дигоксин в реакции 1, 2-гидроксилирования, катализируемой ферментом, продуцируемым недифференцированными клетками *Digitalis Lanata.*

Задача 30

В настоящее время существует проблема недостаточной эффективности хорошо зарекомендовавших себя ранее ЛС (это и β-лактамные препараты, и цефалоспорины I, II, III поколения) вследствие развития к ним антибиотикорезистентности, что в конеч-

ном счете приводит к необходимости постоянного поиска новых ЛС. Антибиотикорезистентность может возникнуть в результате изменения конформации внутриклеточной мишени, изменения проницаемости мембраны бактериальной клетки, ферментативной инактивации антибиотиков, активного (энергозависимого) выброса антибиотиков.

Проведите анализ β-лактамных и аминогликозидиых антибиотиков (на конкретных примерах), имеющих широкое применение в клинической практике, с точки зрения:

• механизма возникновения резистентности;

• сравнения хромосомной и плазмидной резистентности и роли конъюгативных транспозонов в этом процессе;

• возникновения полирезистентности микроорганизмов и госпитальной инфекции.

Вариант ответа

Первоисточником генов резистентности являются спонтанные мутации у почвенных микроорганизмов-продуцентов антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам. Одновременно к источникам генов резистентности относятся гены, кодирующие синтез ферментов собственного антибиотика: они также способны переноситься из продуцентов в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков.

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено наличием генов резистентности как в хромосомах, так и в плазмидах. Особенно опасна плазмидная резистентность в генетическом плане, так как плазмиды передаются из клетки в клетку

путем конъюгации (без деления клетки), но плазмида при этом реплицируется. В то же время некоторые типы плазмид многокопийны. Отсюда возник термин «инфекционная резистентность», т.е. «заражение резистентностью» одних клеток от других.

Также транспозоны (генетические элементы ДНК, способные к самостоятельному перемещению в пределах репликона и вне его) могут нести детерминанты устойчивости к антибиотикам (например, к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину). Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков.

Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп, что обусловливает понятие полирезистентности микроорганизмов. Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций вызывают «госпитальную инфекцию», когда к антибиотикам, которые применяют в клиническом учреждении, возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей.

Причина появления изоферментов с β-лактамазной активностью в том, что микробная клетка защищает себя от антибиотика за счет мутаций в гене, кодирующем последовательность аминокислот в ферменте, участвующем в биосинтезе антибиотика, точнее не в самом ферменте, а в структурном гене этого фермента. Под действием β-лактамаз происходит расщепление β-лактамного кольца, и антибиотик теряет свою активность. При этом мутировавшие хромосомные гены могут оказаться в плазмидах и далее в других клетках, однако в большинстве случаев переноса резистентности не происходит вследствие того, что в экспрессии генов доминируют хромосомные гены клетки-хозяина (реципиента), и антибиотикочувствительность в этом случае будет преобладать над антибиотикорезистентностью.

Ферментативная инактивация аминогликозидов - наиболее часто встречающийся механизм резистентности к этим антибиотикам. Ферменты, инактивирующие аминогликозидные антибиотики, относят к классу трансфераз, они катализируют замещение гидроксильных групп у аминогликозидов остатками фосфорной или адениловой кислоты, а аминогруппы аминогликозидов замещают остатками уксусной кислоты (фосфотрансферазы, аденилтрансферазы, ацетилтрансферазы). Достаточно заменить только одну функциональную группу у аминогликозидного антибиотика, и он полностью инактивирован. Вместе с тем эти ферменты у грамотрицательных микроорганизмов имеют внутриклеточную локализацию, в отличие от β-лактамаз грамположительных микроорганизмов, которые являются гидролазами и относятся к внеклеточным ферментам.

Активный выброс антибиотиков из клетки возможно показать на примере тетрациклинов и противоопухолевых препаратов. Система активного выброса локализуется в цитоплазматической мембране клетки и не позволяет антибиотикам достигать своей мишени, делая их неэффективными. Она состоит из «белка-ловушки», «линкерного белка» и «белка помпы».

Задача 31

Важнейшие группы антибиотиков, образуемых грибами, пенициллины и цефалоспорины, известны также под общим названием «β-лактамные антибиотики». Они образуются двумя родами плесневых грибов, среди которых наиболее широко известны два продуцента β-лактамов. Структура, от которой зависит их антимикробная активность, это весьма реакционноспособное четырехчленное β-лактамное кольцо (циклический амид). В этом кольце происходит замыкание связи между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы при β-углеродном атоме. На основе природных пенициллинов и цефалоспоринов получены также и их полусинтетические аналоги.

Проведите анализ β-лактамных антибиотиков с позиций:

- механизма образования (биосинтеза) на примере пенициллина;
- химической структуры, биологической активности и механизма действия;
- требований к производству этих антибиотиков согласно правилам GMP.

Вариант ответа

Предшественники β-лактамных антибиотиков - аминокислоты, преобразование которых путем ферментативных реакций ведет к формированию β-лактамной структуры. Сначала из трех аминокислот, L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина, L-валина, синтезируется LLD-трипептид. В его образовании участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи и ферменты, превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин. Затем LLD- трипептид превращается в моноциклический β-лактам. Следующий этап - синтез пятичленного серосодержащего кольца, сконденсированного с β-лактамным. Далее идут ферментативные реакции с образованием бензилпенициллина (продуцент - *Penicillium chrysogenum)* или цефалоспорина C^p (продуцент - *Acremonium chrysogenum).* В первом случае в реакцию вступает ФУК и образуется бензилпенициллин, освобождается аминоадипиновая кислота и кофермент А. Во втором случае происходит «экспансия», т.е. расширение пятичленного кольца в шестичленное, катализируемое ферментом «экспандазой», и далее формируется молекула цефалоспорина C^p.

Биологическая активность антибиотиков (бактериостатический, бактерицидный, а иногда и литический эффект на клетки) как

избирательных ингибиторов метаболизма бактериальной клетки осуществляется посредством их взаимодействия с внутриклеточной мишенью, что вызывает также каскад вторичных реакций.

β-Лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и другие вещества β-лактамной структуры) относятся к ингибиторам образования клеточной стенки бактерий вследствие избирательного подавления активности тех или иных ферментов, включенных в многоэтапный синтез основного полимера клеточной стенки - пептидогликана. Во время биосинтеза пептидогликана (чередование остатков мурамовой кислоты и N-

ацетилглюкозамина) они подавляют катализируемое ферментами замыкание пептидных цепочек в пептидные мостики, соединяющих остатки мурамовой кислоты. В результате гликановые нити и пептидные мостики гидролизуются, так как нарушается равновесие синтеза пептидогликана и его ферментативного гидролиза. Формирования непрерывной сети пептидогликана не происходит. В животных клетках нет пептидогликана, и поэтому β-лактамы не токсичны для человека и животных. Токсичность и аллергенность никак не связаны с механизмом их антибактериального действия. Для производства антибиотиков β-лактамной структуры в соответствии с правилами GMP требуется полная изоляция этого производства от производства других лекарственных препаратов. Это объясняется тем, что β-лактамы проявляют аллергенное действие уже в крайне малых количествах и, попадая в другие ЛС, могут вызвать у сенсибилизированных больных серьезные осложнения.

Задача 32

В настоящее время доказано, что невозможно полностью избавиться от генов резистентности, однако бороться с антибиотикорезистентностью можно.

Обоснуйте необходимость периодического обновления номенклатуры антибиотических препаратов на основе:

• целенаправленной химической трансформации природных антибиотиков на примере β-лактамных и аминогликозидных антибиотиков;

• информации о системах активного выброса антибиотиков из клетки;

• данных о MDR, об образовании инактивирующих антибиотики изоферментов, о фенотипах опухолей и возможности борьбы с резистентностью опухолей.

Вариант ответа

Известно, что первоисточник генов резистентности - почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков. Эти гены могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам.

β-Лактамы инактивируются β-лактамазами, которые расщепляют их β-лактамное кольцо. Основной путь борьбы с β-лактамазами - создание молекул ЛС, которые не захватываются активным центром β-лактамаз. Представителями таких ЛС являются полусинтетические антибиотики (оксациллин, метициллин, карбенициллин и т.д.), которые не чувствительны к пенициллазам. Механизм создания полусинтетических пенициллинов:

• отщепление бензильного радикала (остается 6-АПК);

• введение химическим путем других радикалов. Аналогичная работа возможна с цефалоспоринами при присоединении различных радикалов к 7-аминоцефалоспорановой кислоте.

Другим направлением является использование комбинированных препаратов, содержащих антибиотик вместе с ингибитором β-лактамаз. Примеры: уназин♠ (ампициллин + сульбактам); амокси- клав* (амоксициллин + клавулановая кислота); аугментин* (амоксициллин + клавулановая кислота, но в другом соотношении).

Если резистентность обусловлена наличием генов клетки, которые делают мембраны непроницаемыми для антибиотика (сужаются поры или снижается их количество), то в этом случае можно использовать β-лактамные антибиотики имипинем, карбопинем[р], веропинем[р], образующие, по сравнению с пенициллином, меньшие по размерам цвиттер-ионы, легко проникающие через пориновые каналы.

Можно также использовать и имитационные структуры переносчика, жизненно необходимого для клетки, проходящего через пориновые каналы. Так, например, был создан цефалоспорин, имитирующий переносчик железа, который, попадая в клетку, угнетал синтез пептидогликана, ингибируя транспептидазу.

Цефалоспорины III поколения (в частности, цефтазидим), хотя и не расщепляются β-лактамазами, но являются индукторами выработки этих β-лактамаз. Цефалоспорины IV поколения (цефипим, цефпиром) уже не являются индукторами β-лактамаз.

Структурная формула амикацина включает фрагмент γ-оксимасляной кислоты, который защищает этот высокоактивный антибиотик от инактивации со стороны изоферментов.

Система активного выброса антибиотиков обнаруживает в цитоплазматической мембране новые белки, проникающие в клетку. Эта система белков включает в себя «белок-ловушку, «линкерный белок» и «белок-помпу».

Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении противоопухолевых антибиотиков, что предопределяет их низкую терапевтическую эффективность.

Пути повышения эффективности: создание липосомальных лекарственных форм антибиотиков, применение конъюгатов цефалоспоринов с фторхинолонами. Последние рассматривают как «prodrugs» (предлекарства), механизм их действия связан с подавлением активности транспептидаз пептидогликана и ДНК-гиразы. Так, оливомицин, рубомицин*, доксорубицин, блеомицин подавляют синтез и ДНК, и РНК одновременно, поэтому очень токсичны.

Задача 33

У патогенных микроорганизмов открыты гены, существенные для инфекционного процесса, но не существенные при росте в искусственных условиях на искусственных питательных средах *(in vitro)*. Эти гены (ivi-гены или гены вирулентности) не поддаются идентификации и, таким образом, не могут быть использованы как таргеты (мишени) при поиске новых антибактериальных ЛС.

Докажите существенность гена-мишени при поиске новых ЛС, используя понятия:

- «house keeping gens» («гены домашнего хозяйства», «гены, на которых держится дом»);

• «ivi-gens»;

• «система IVET» как часть международных геномных исследований.

Вариант ответа

Большинство генов, продукты которых необходимы клетке всегда, получили название *«house keeping* gens», что можно перевести, как «гены, на которых держится дом». Они экспрессируются в любых условиях, так как клетка без них не может существовать. Продукты экпрессии именно этих генов обнаруживают на питательных средах *in vitro,* поэтому практически все антибиотики, применяемые в клинической практике, являются ингибиторами функций именно этих генов.

Продукты некоторых генов не идентифицируют на питательных средах, и поэтому их дальнейшее использование в качестве тарге-

тов при поиске новых ЛС невозможно. Эти так называемые молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название ivi-генов или генов вирулентности. Соотношение между *house keeping*и ivi-генами в геноме у разных патогенных бактерий варьирует, но в среднем более 90% генов относится к 1-й группе *(house keeping).*

ivi-Гены, как правило, играют определяющую роль в развитии инфекционного процесса. Именно поэтому значительный интерес представляют пути выявления и выделения этих генов. Примером такой работы служит предложенный американскими генетиками метод «IVET» *(In Vivo* Expression Technology). Краткая суть метода описана ниже.

• Геном патогенной бактерии (например, *Salmonella typhimurium)* с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов (x_1, x_2, x_3 ... x_n).

• Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфениколацетилтрансферазы *(cat).* Такой ген (без промотора) не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако этот ген сможет реплицироваться, если соединенный с ним ген (фрагмент ДНК сальмонеллы - x_1, x_2, x_3 ... x_n) будет иметь промотор для своей репликации. Тогда этот промотор будет вызывать репликацию не только своего гена, но и следующего за ним гена (без промотора). Таким образом, репликация гена хлорамфениколацетилтрансферазы может происходить за счет использования или «захвата» чужого промотора.

К этому сдвоенному фрагменту *(x-cat,* где *x* - фрагмент генома сальмонеллы, а *cat* - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы) присоединяется лактозный оперон *(lac Z)* также без промотора. Этот оперон нужен системе для окисления лактозы.

• Полученный фрагмент *(x-cat-lac Z)* включается в плазмиду. При этом получается набор плазмид, отличающихся только по фрагменту х.

• Полученные плазмиды вводят в клетку *E. coli.*

• Далее в организм лабораторного животного (мыши) вводят клеточную суспензию *E. coli* и хлорамфеникол.

• Через сутки из слизистой оболочки желудка мыши на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.

• Затем колонии анализируют. 90% полученных колоний имеет красный цвет (при окислении лактозы меняется pH и соответственно цвет среды); 10% - бесцветные или белого цвета.

Если на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветная колония, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагментах *«x»* не экспрессировался. Вероятно, он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам *ivi* (генам вирулентности). В случае наличия колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу, в результате изменяется цвет индикатора, и колонии окрашиваются в красный цвет.

Используя данный метод, авторы выделили из клеток *E. coli* около 100 ivi-генов, из которых 50 были новыми (не описанными ранее) и представляли интерес как потенциальные таргеты для отбора антимикробных агентов.

Задача 34

В основе любого производства фармацевтических препаратов, в том числе и биотехнологического, должна быть заложена рентабельность, стабильность, высокий уровень качества. Вместе с тем ЛС должны быть эффективны и безопасны при применении.

Проанализируйте целесообразность достижения поставленных целей на примере:

• сочетания биосинтеза и органического синтеза при производстве β-лактамов и аминогликозидов;

• производства D-циклосерина, аминокислот, витаминов;

• производства хлорамфеникола (левомицетина♠).

Вариант ответа

Любое фармацевтическое производство по способу получения целевого продукта подразделяется на химическое, биологическое, химико-энзиматическое, микробиологическое (широко применяется различное сочетание этих методов). Так, D-циклосерин целесообразно получать микробиологическим синтезом (продуцентом являются актиномицеты), так как он менее токсичен, чем D-циклосерин, полученный методом органического синтеза. При этом если D-циклосерин активен, то L-циклосерин - нет. Именно поэтому в данном случае приоритет остается за микробиологическим производством, поскольку оно, в отличие от химического синтеза, дает гарантии

получения только D-циклосерина, обеспечивая тем самым рентабельность производства, терапевтическую активность и безопасность производимого препарата. Противоположный пример: получение левомицитина* на основе природного продуцента является нецелесообразным, так

как активность природного штамма очень низка, а также он весьма капризен по отношению к питательным средам.

Примером выгодного сочетания органического синтеза и биосинтеза является производство аскорбиновой кислоты, в котором этап превращения D-сорбита в L-сорбозу осуществляется уксуснокислыми бактериями*Gluconobacter oxydans.* Или, например, можно привести получение ампициллина и других полусинтетических антибиотиков β-лактамной структуры (оксициллин, карбенициллин, метициллин и др.) из пенициллина (антибиотик, образуемый плесневыми грибами *Penicillium chrysogenum).* Проведение химического деацилирования бензилпенициллина как исходного сырья для получения 6-АПК требует биотрансформации, которая, не разрушая β-лактамного кольца, расщепляет именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК. Дальнейший химический синтез ведет к образованию соответствующего радикала (ацилирование 6-АПК). Здесь же можно привести пример преобразования аминогликозидных антибиотиков (например, канамицина) с целью получения новых ЛС методом мутасинтеза. Сначала генетики-биотехнологи получают штамм «блокмутант», который имеет «блок-фермент» по аминоциклитолу. Далее аминоциклитол химически модифицируют и включают в молекулу антибиотика, синтезируемую штаммом «блок-мутантом». Полученные методом мутасинтеза конечные продукты называют мутасинтонами.

Задача 35

Витамины как группа незаменимых органических соединений различной химической природы необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. С помощью биотехнологии сегодня можно получать в необходимых количествах такие витамины, как B_2♠, B_{12}♠, β-каротин♠, витамин РР♠, эргостерин[р], аскорбиновую кислоту.

Проведите сравнительный анализ получения вышеуказанных витаминов с помощью биотехнологии, принимая во внимание:

- биообъекты, которые используют в каждом конкретном случае;
- получение суперпродуцентов рибофлавина и витамина B_{12};
- преимущества биотехнологического производства витаминов.

Вариант ответа

С помощью биотехнологии производство витаминов стало не только высокорентабельным (не требует дорогостоящего оборудования), но также экологичным (без агрессивных сред) и безвредным

для работающего персонала. Известно, что высокой биологической активностью часто обладают не сами витамины, а их производные - коферменты. Например, для рибофлавина характерно функционирование в двух коэнзимных формах: флавиномононуклеотида и флавинадениндинуклеотида. Активным продуцентом рибофлавина является культура дрожжеподобного гриба *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossipii*. Сверхсинтеза рибофлавина достигают при использовании мутагенов для нарушения механизма ретроингибирования у продуцентов. Одновременно для активного биосинтеза целевого продукта в питательную среду вносят соевую муку или кукурузный экстракт, сахарозу, карбонат кальция, хлорид натрия, витамины. Кроме того, методами генной инженерии получен рекомбинантный штамм-продуцент *(Bacillus subtilis)* с повышенной устойчивостью к экзогенной контаминации.

Продуцентом витамина B_{12}♠ являются пропионовые бактерии, продуктивность которых резко повышается при добавлении в среду предшественника витамина B_{12}♠ - 5, 6-диметилбензинзимидазола - и использовании мутантных штаммов. Если 5,6-диметилбензимида- зол не добавлять, то вместо витамина B_{12}♠ синтезируется фактор В (кобинамид) и псевдовитамин B_{12}, которые не обладают терапевтическим эффектом.

Продуцентом кофермента НАД являются пекарские дрожжи. Выход НАД значительно увеличивается при добавлении в среду предшественников (аденина и никотинамида). Кроме того, можно повысить проницаемость мембран, обрабатывая клетки микроорганизмов ПАВ (поверхностно-активными веществами), например цетилсульфатом натрия и др.

При производстве аскорбиновой кислоты используют биотрансформацию D-сорбита в L-сорбозу уксуснокислыми бактериями.

В качестве промышленного источника эргостерина[р] применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisae.*

Получение β-каротина* возможно микробиологическими методами, однако при этом нужно использовать дорогие среды сложного состава, поэтому более рентабельным является химический синтез.

Преимущества использования биотехнологических методов при производстве витаминов:

- возможность селекции высокоактивных штаммов с применением генной инженерии;
- высокий уровень ферментации;
- применение иммобилизации клеток;
- утилизация отходов, снижение себестоимости и экологичность. Задача 36

Особенно заметно достоинства биокатализаторов проявляются при модификации пространственной структуры стероидных соединений. Долгое время микробиологическая трансформация относилась исключительно к специфическим методам химии стероидов. Внедрение методов микробиологического синтеза для получения БАВ различной химической структуры вызвало бурное развитие фармацевтической промышленности, позволив многократно удешевить ценные лекарственные препараты.

Проанализируйте возможность биоконверсии (биотрансформация, биокатализ) на примере получения гормональных препаратов гидрокортизона и преднизолона с выбором:

- источников сырья для производства ЛС стероидной структуры;
- основных реакций биотрансформации;

технологических параметров ферментационного процесса. Прокомментируйте явление сочетания высокого выхода целевого

продукта по субстрату в процентном отношении и низкой производительности ферментации.

Вариант ответа

Наиболее экономичный источник получения стероидных препаратов - β-ситостерин, содержащийся в растениях и отходах древесины. В качестве коммерческого источника сырья β-ситостерина используют тростник и хлопковое масло. Диосгенин содержится в растении диоскорее (это импортное и дорогое сырье). Соласодин содержится в паслене дольчатом, растет в Казахстане (также дорогое сырье). При микробиологической трансформации ситостерина путем окисления боковой цепи стерина мутантными штаммами *Mycobacterium vacca* образуется 17-кетоандростан. Полученный 17-кетоандростан уже химическими методами превращают в ЛС, например тестостерон и его эфиры - метилтестостерон, оксипрогестерон* и др. В этом случае вследствие слабой растворимости стероидов применяют фильтрование культуральной жидкости с отделением биомассы и добавлением ацетона с дальнейшей перекристаллизацией концентрата ацетонового раствора.

Ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит вещество Рейхштейна, которое биотрансформируется культурой *Corynebacterium mediolanum.*

Основные реакции биотрансформации. При получении кортизона это 11-α-гидроксилирование с использованием гриба *Rhizopus nigricans,* дегидрогенизацией кортизона и гидрокортизона с помощью бактерий и актиномицетов можно получать преднизолон. Окисление гидроксильной группы в кетогруппу можно осуществлять при использовании бактерий, актиномицетов, грибов. В ферментационных процессах реакция гидролиза эфиров стероидов определяет технологическую специфику их получения, когда высокий процент выхода целевого продукта по субстрату сочетается с низкими затратными показателями ферментационного процесса. Повышения растворимости

стероидов достигают механическим и ультразвуковым измельчением, использованием водорастворимых форм стероидов, образованием растворимых комплексов с циклодекстрином (природный циклический олигосахарид с гидрофильно/гидрофобными свойствами).

В настоящее время при производстве ЛС стероидной структуры активно используют иммобилизацию клеток штаммов-микроорганизмов.

Задача 37

Наукоемкое и высокоэффективное биотехнологическое производство, являясь малоэнергозатратным, дает возможность значительно уменьшать количество отходов, при этом самих природных ресурсов расходуется незначительное количество. Так, потребление ресурсов (энергии) составляет всего 0,6-1% от всей промышленности, потребление воды - 0,01%, выброс вредных веществ в атмосферу также невелик. Вместе с тем огромное значение биотехнология имеет в поддержании экологического равновесия в природе, несмотря на агрессивную политику человека в ее отношении в целом.

Учитывая приведенную информацию, проанализируйте использование биотехнологии в решении экологических задач в части:

- совершенствования самого биотехнологического производства;
- очистки газообразных, жидких и твердых отходов;
- использования «активного ила» и «штаммов-деструкторов».

Вариант ответа

Ниже перечислены направления совершенствования биотехнологического производства.

- Совершенствование технологических параметров биосинтеза: выбор продуцента, замена дефицитных сред на менее дефицитные, применение иммобилизации биообъектов.
- Совершенствование методов выделения и очистки, введение мембранной технологии.
- Соблюдение правил GMP.

Экологические проблемы биотехнологии: уничтожение твердых отходов (биомассы продуцента), очистка жидких отходов (культуральная жидкость), ликвидация газообразных отходов. Самым примитивным способом утилизации мицелия после его высушивания является вывоз на городские свалки. Другой способ: мицелий помещают в грунтовые ямы на бетонный пол, перемешивают с почвой и оставляют на несколько лет (способ удобный, но нерентабельный).

Более перспективные пути утилизации:

- мицелий можно стерилизовать и затем добавлять в корм сельскохозяйственных животных;

• можно добавлять его в строительные материалы;

• можно извлекать различные фракции из мицелия, например липидную, используя ее как детергент вместо дефицитного китового жира или синтетических пеногасителей.

Очистка жидких отходов (культуральная жидкость) - это система, состоящяя из нескольких последовательных блоков: первого отстойника с отсосом и аэротенка (железобетонный бассейн с подачей воздуха по трубам в его нижней части). На этой стадии 80-90% органических веществ под воздействием микроорганизмов преобразуется в «активном иле» аэротенка, 70% которого составляет род *Pseudomonas,*20% - род *Bacterium* (грамположительные палочки), 10% - род *Bacillus* и грамотрицательные кокки. Интенсивная подача воздуха необходима для увеличения окислительной активности микроорганизмов, входящих в состав «активного ила».

Далее следует второй отстойник для осаждения «активного ила». Затем снова аэротенк и блок доочистки с биофильтрами, где происходит полная деструкция трудноокисляемых соединений штаммамидеструкторами (искусственно созданные генно-инженерные конструкции - очень нестойкие микроорганизмы). Коммерческие названия: «Thermobac», «Polibac» и др.

Задача 38

Востребованность препаратов на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов (нормофлоры, пробиотики) не вызывает сомнений. Эта продукция относится к чисто биотехнологическому производству, а рынок таких препаратов имеет тенденцию к расширению и даже в какой-то степени конкурирует с антибиотиками.

Охарактеризуйте препараты живых культур микроорганизмов, учитывая:

свойства пробиотиков; микроорганизмы, служащие основой для получения пробиотиков и требования к биообъектам в условиях промышленного производства;

• особенности ферментации (режим, продолжительность, оптимальные фазы роста);

• особенности их применения (виды препаратов, параметры стандартизации и возможность сочетания с антибиотиками).

Вариант ответа

Пробиотики - живые микроорганизмы и/или вещества микробного либо иного происхождения, оказывающие благоприятные эффекты как на физиологические функции, так и на биохимические и поведенческие реакции организма хозяина, оптимизируя его микробиологический статус. Технология получения таких препаратов предполагает наличие штаммов микроорганизмов-симбионтов. Их выделяют из кишечного содержимого здоровых детей и взрослых и идентифицируют. Эти штаммы должны обладать высокой антагонистической активностью, способностью прикрепляться к эпителию кишечника, не гидролизовать кишечную слизь, не повреждать клетки кишечного эпителия. Штаммы проверяют на патогенность и токсичность *in*

vitro. Наконец, они должны быть технологичны, т.е. хорошо расти и размножаться на искусственных питательных средах. Штаммы также должны быть криорезистентны.

В условиях промышленного производства штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые пересевают на агаризованные или жидкие питательные среды. В процессе ферментации (несколько часов) получают бактериальную суспензию, добавляют раствор криопротекторов (молоко, желатин, лактоза, сахароза) и разливают в ампулы. Далее следует заморозка в жидком азоте и лиофильная сушка. Режим ферментации периодический. Собирают штаммы в той фазе роста, при которой выживание клеток культуры является наиболее стабильным, что обеспечивает последующее длительное хранение препарата и обычно определяется экспериментально. Как правило, это конец экспоненциальной фазы и начало стационарной.

Препараты пробиотиков: колибактерин* на основе кишечной палочки; бифидумбактерин* на основе штамма*Bifidobacterium bifidum;* бификол* - смесь *Bifidobacterium bifidum* и *E. coli* - и др.

Применение: в педиатрии, в инфекционных клиниках, при длительных кишечных расстройствах, дисбактериозах, при антибио-

тикотерапии. Стандартизацию препаратов-пробиотиков проводят на соответствие паспортным данным штамма, при этом побочные эффекты должны отсутствовать даже при применении препаратов в избыточных дозах.

Задача 39

Аминокислоты известны как составные элементы белков. Биологически активными являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве или самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), или в составе смесей для парентерального питания, и в фармацевтической промышленности при синтезе различных ЛС. Используют их и как добавки при коррекции питания. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химикоэнзиматическим, микробиологическим. В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе определенный и довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции.

С учетом представленной информации проведите сравнительный анализ:

- предложенных методов получения аминокислот на конкретных производствах;
- выбора микроорганизмов-биообъектов для создания штаммовсуперпродуцентов;
- особенностей подбора питательных сред с учетом ферментативной регуляции биосинтеза на клеточном уровне.

Вариант ответа

При получении аминокислот применяют различные методы:

• Биологический метод (гидролиз белоксодержащих субстратов) наиболее дешевый. Однако существуют ограничения по стандартизации и по источникам сырья. Также из-за проблемы чистоты препаратов необходима многоступенчатая химическая очистка с частичным разрушением целевых продуктов (триптофан, треонин, серин, цистеин и др.).

Химический синтез: образуется смесь D и L-изомеров, тогда как биологически активными являются только L-изомеры аминокислот. Такое производство дорого, небезопасно и неэкологично. Тем не менее производство аминоуксусной кислоты (глицина) и метионина данным методом рентабелен (в первом случае из-за отсутствия изомеров, во втором - вследствие равной терапевтической активности изомеров).

• Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химически синтезируют предшественник аминокислоты, например карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток. Таким путем можно получать, например, аспарагиновую кислоту на основе фумаровой или фенилаланин на основе коричной кислоты. Однако способ дорогой и сложный.

• Микробиологический метод. Обязательным условием возможности его использования является наличие штаммов-суперпродуцентов аминокислот. В качестве модельных микроорганизмов применяют некоторые штаммы *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum.*

Критерии отбора биообъектов для создания промышленных штаммов. Прежде всего получение ауксотрофных мутантов, что предполагает использование только тех микроорганизмов, которые имеют разветвленный путь биосинтеза по крайней мере двух аминокислот, образующихся из одного предшественника. Их биосинтез контролируется на уровне первого фермента общего участка согласованным ингибированием конечными продуктами (ретроингибирование). Кроме того, в селекции продуцентов аминокислот активно применяют методы генной инженерии. Например, при вставке генов треонина в плазмиды для их клонирования значительно повышается количество ферментов, ответственных за биосинтез соответствующей аминокислоты. Особенностью питательных сред является добавление в ограниченном количестве той аминокислоты, биосинтез которой блокирован в результате мутагенного воздействия.

Таким методом получают, в частности, глутаминовую кислоту, лизин, треонин.

Задача 40

Иммунобиотехнология вносит весомый вклад в создание ЛС, профилактических и диагностических препаратов. Однако не у всех людей и не всегда иммунная система обеспечивает защиту организма от различных микробных и вирусных инфекций. Она может быть неадекватна внешним условиям, и иногда требуется помощь в усилении иммунного ответа.

При анализе данной ситуации:

• сопоставьте виды и цели иммунизации с классификацией вакцин по способам их получения и применению;

• свяжите атакующие агенты (ксенобиотики) с ответной реакцией организма, используя понятия «антиген», «антитело», «антигенные детерминанты» («эпитопы»), «гаптены»;

• прокомментируйте проявление иммунного ответа и способы его усиления.

Вариант ответа

Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей как иммунобиопрепараты вызывают активную иммунизацию посредством возникновения в организме человека или животного антител, вызывающих блокировку пролиферации патогенного микроорганизма, что не позволяет развиться заболеванию. Сюда относятся живые и аттенуированные вакцины, получаемые путем культивирования штамма либо в курином эмбрионе, либо в других культурах животных клеток. Примером дивергентной вакцины (с общим протективным антигеном у непатогенного для человека микроорганизма и с патогенным для человека возбудителем инфекции) служит вакцина против натуральной оспы человека, в которой использован непатогенный для человека вирус оспы коров. Кроме того, это и БЦЖ-вакцина (с родственными в антигенном отношении микобактериями бычьего типа).

Далее можно отметить рекомбинантные вакцины (выделенный ген вируса вставляют с помощью вектора в дрожжевую клетку или в клетку кишечной палочки), к примеру вакцина против гепатита В.

Кроме того, существуют комбинированные вакцины, в частности АКДС (дифтерийный, столбнячны

анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены).

Неживые вакцины (инактивированные) включают в себя убитые культуры патогенных бактерий или вирусов (цельноклеточные, цельновирусные вакцины) или комплексы из патогенных микробов с протективными антигенами (субклеточные, субвирионные вакцины).

В молекулярных вакцинах антиген находится в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т.е. в виде эпитопов, детерминант.

Задача 41

Вакцины и сыворотки, как известно, применяют с целью профилактики или лечения. Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем

самым защищает его от инфекции. В случае введения сыворотки организм получает уже готовые антитела.

Сопоставьте вакцины и сыворотки как профилактические средства:

- по иммунному ответу;
- по способу получения и применению;
- по эффективности их использования.

Вариант ответа

Благодаря сыворотке организм человека защищен пассивным иммунитетом, соответственно готовыми антителами. В случае введения вакцины организм человека в ответ на полученный антиген сам вырабатывает антитела. Для массового производства сывороток проводят иммунизацию домашних животных, например ослов и лошадей. Очень важно, чтобы сыворотки, полученные таким путем, постоянно контролировали по такому показателю, как титр антител у животных, и в момент взятия крови содержали бы максимальное количество антител.

Технология получения сывороток, в отличие от вакцин, несложна. Вначале выделяют плазму крови, потом удаляют из нее фибрин. Это один способ получения сыворотки.

Можно получать сыворотки из культивируемых животных клеток, однако здесь главной проблемой является обеспечение стабильного роста животных клеток. Очень часто изолированные клетки животных просто не делятся *in vitro*. Именно поэтому для получения эффективного результата нужно, чтобы эти клетки значительно преобладали в культуре, быстро адаптировались к новым условиям и быстро росли при полной стерильности процесса и сред. Вода также должна быть стерильной.

Помимо этого существуют такие проблемы роста животных клеток, как генетическая нестабильность, непостоянство генетических экспрессий, старение.

В качестве материала для культивирования можно использовать почки обезьян, собак, кроликов, куриный эмбрион (14 дней).

Питательные среды должны содержать аминокислоты, белки, липиды, углеводы, витамины, глюкозу, предшественники простагландинов, неорганические соли, микроэлементы. Температура культивирования составляет +37 °С.

Консервируют посевной материал клеток (резервный фонд популяции) в жидком азоте при температуре -196 °С в ампулах объемом 1 мл.

Процесс замораживания может иметь негативные последствия: образование кристаллического льда в клетке, обезвоживание, повышение концентрации растворенных веществ, поэтому замораживание животных клеток осуществляют в малых объемах (1 мл) с использованием криопротекторов, а скорость замораживания/раз- мораживания колеблется в строго определенных пределах.

Задача 42

Известно, что главным компонентом иммунохимической реакции являются антитела (иммуноглобулины), представляющие собой белки сыворотки крови, синтезируемые в организме человека в качестве проявления защитной реакции (иммунитета) при попадании в него чужеродного вещества (ксенобиотика).

Сопоставьте функции иммуноглобулинов (антител):

• с их классификацией и структурой;

• со схемой взаимодействия антигена с антителом, представлением о структуре антигена;

• с принципами расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов.

Вариант ответа

Основной элемент структуры антител - четырехцепочечная молекула, состоящая из двух пар идентичных полипептидных цепей: легких (L) и тяжелых (H). Все цепи соединены дисульфидными связями. К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахаридные фрагменты. Различают 5 классов иммуноглобулинов человека: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, полипептидные цепи которых образуют глобулярные домены, состоящие из 110-115 аминокислотных остатков. Именно они и определяют биологические свойства иммуноглобулинов. Вариабельные домены легких и тяжелых цепей образуют активный центр антител соответствующей специфичности. Антитела формируются только к небольшим участкам на поверхности молекулы белка, которые называются антигенными детерминантами и представляют собой выпуклые части молекулы, которые могут входить внутрь активного центра антител. В случае бактериальных клеток такими детерминантами служат короткие цепочки из 3-5 остатков сахаров, образующих стенку бактерий. Низкомолекулярные соединения, в частности лекарственные вещества, сами по себе не могут вызывать образование антител. Такие соединения называют гаптенами. Однако если они присоединяются к макромолекуле, организм начинает вырабатывать к ним антитела.

На первой стадии иммунохимической реакции происходит «склеивание» антигена и антитела, а вторая идет с образованием комплексов сложного состава, что определяется помутнением раствора либо выпадением осадка. Так, если в пробирку с раствором, содержащим постоянную концентрацию антител и меченого антигена, добавить различные количества немеченого антигена, то концентрация комплекса антиген-антитело с меткой будет обратно пропорциональна концентрации немеченого антигена. Для расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов в один из компонентов системы вводят маркер, концентрацию которого можно легко определить.

Задача 43

Очевидно, что биосинтез ЛС необходимо проводить в асептических условиях. Тем не менее проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов

для наружного применения остается одной из самых сложных при производстве ЛС. В этом случае можно обратиться к радиационной стерилизации ЛС.

Предложите выбор радиационной стерилизации фармацевтических препаратов на конкретных примерах, используя ваши представления:

- о видах и дозах облучения, режиме стерилизации, установках;
- о лекарственных формах, разрешенных для этого вида стерилизации;
- о причинах влияния облучения на внешний вид порошка и стеклянную тару.

Вариант ответа

В реальных условиях радиационную или лучевую стерилизацию применяют на отдельных производствах. Разрешенными для стерилизации ЛС являются γ-лучи изотопа кобальта (^{60}Co) и быстрые электроны с энергией не выше 5 млн эВ (электроновольт), получаемые на ускорителях при отсутствии наведенной радиации у обработанных лекарственных препаратов (нет расщепления атомного ядра). Стерилизующая доза ионизирующего облучения составляет 2,5 млн рад, т.е. 2,5 мегарад.

Промышленная установка представляет собой герметическую стерилизационную камеру со стандартными стержнями с ^{60}Co. Стержни могут автоматически вдвигаться и удаляться из камеры. Режим стерилизации подбирают таким образом, чтобы нужная доза набиралась препаратом примерно за сутки. В случае применения быстрых

электронов стерилизующая доза набирается за несколько секунд. Флаконы подаются по одному к «окошку», набирают дозу и двигаются дальше.

Лучевая стерилизация обеспечивает необходимый результат, при этом лекарственные препараты сохраняют свою активность и удовлетворяют фармакопейным тестам. Внешний вид облученных препаратов может меняться, например белые порошки теряют блеск и приобретают матовый оттенок.

Также необходимо иметь в виду, что под влиянием облучения меняется кристаллическая решетка стекла. Оно мутнеет, темнеет, но при этом полностью сохраняет свои функциональные качества. Потемнение стекла обратимо и со временем исчезает.

Существует опыт применения такой стерилизации на примере антибиотиков. Порошки красного цвета (актиномицины) и желтого (тетрациклины) становятся более тусклыми, но обладают прежней активностью. При стерилизации природных и полусинтетических пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов снижения активности также не происходит. Исключение составляют полиеновые антибиотики: например, нистатин заметно теряет свою активность.

Задача 44

На сегодняшний день производство иммунодиагностикумов можно рассматривать как самостоятельную область биотехнологической промышленности. Моноклональные антитела диагностического назначения, получаемые с использованием гибридомной технологии, представлены широким ассортиментом наборов фармацевтической продукции во всем мире. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов.

Учитывая большой спектр использования иммунохимического анализа:

• выберите наиболее важные области его применения;

• представьте схему получения моноклональных антител;

• приведите пример использования тест-системы иммунохимического анализа в общей схеме экспресс-анализа хорионического гонадотропина.

Вариант ответа

Самые важные области применения иммунохимического анализа - контроль банков крови, обнаружение возбудителей во внешней среде, диагностика инфекционных заболеваний, диагностика диа-

бета. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов, однако наиболее широко распространено использование моноклональных антител, так как они являются практически чистыми реагентами, обладают стабильными характеристиками и доступны в неограниченных количествах.

Схема получения моноклональных антител. Каким-либо синтетическим конъюгированным антигеном иммунизируют мышей. Затем лимфоциты из селезенки мыши сливают с помощью ПЭГ с клетками стабильной миеломной линии. Из полученных гибридных клеток отбирают только те, которые унаследовали от клеток селезенки способность продуцировать антитела к ЛС, а от миеломных (опухолевых) клеток - способность к неограниченному росту. Их культивируют и получают клон клеток, продуцирующих антитела к лекарственному препарату. Этот клон прививают мышам для получения асцитных опухолей, и уже из асцитной жидкости выделяют антитела.

При определении хорионического гонадотропина методом твердофазного ИФА на полистирольные шарики сорбируют моноклональные антитела к хорионическому гонадотропину. К сенсибилизированным шарикам добавляют исследуемую пробу (мочу) и конъюгат, состоящий из маркера и моноклональных антител к другой детерминанте гормона. В результате иммунологической реакции хорионический гонадотропин связывается одной детерминантой с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности шариков, а другой - с моноклональными антителами конъюгата с маркером (фермент пероксидаза). Затем шарики отмывают от всех несвязавшихся компонентов мочи и определяют активность фермента в составе иммунных комплексов с

помощью субстратхромогенной смеси. Степень окраски раствора прямо пропорциональна количеству хорионического гонадотропина в образце мочи.

Задача 45

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам конкретного производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации используйте особенности:

- конструкции ферментера («обвязка ферментера»);
- систем регуляции процесса, устройств теплосистем и массообмена;
- устройств систем аэрации.

Вариант ответа

Объем ферментационных аппаратов для промышленного производства, например антибиотиков, колеблется от 1 до 150 $м^3$. Цилиндрическая поверхность снабжена так называемой тепловой рубашкой, представляющей собой систему змеевиков для обеспечения постоянной температуры. Также ферментер снабжен мешалкой (пропеллерной, турбинной) для обеспечения хорошего массообмена и специальным устройством для подачи стерильного воздуха определенной температуры - барботером. В нижней части аппарата имеются отбойники, необходимые для создания вихревых потоков, которые препятствуют образованию «застойных зон». Выращивание посевного материала проходит в отдельном ферментере - инокуляторе. Современные ферментеры снабжены контрольно-измерительной аппаратурой, которая обеспечивает контроль pH, температуры внутри ферментера, количества кислорода в среде, давления внутри аппарата и т.д.

Важность аэрации на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство используемых микроорганизмов-продуцентов являются аэробами. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности, что требует регулирования скорости подачи воздуха в аппарат. Регуляцию осуществляют по совокупности параметров, характеризующих метаболическую активность культуры: скорости потребления углерода, азота, кислорода, интенсивности дыхания, изменения pH, концентрации растворенного кислорода, вязкости культуральной жидкости, концентрации биомассы и т.д. Кроме того, добавление компонентов питательной среды ведет к значительному разбавлению культуральной жидкости и увеличению ее объема в ферментере, что позволяет делать периодические отборы культуральной жидкости, которая затем передается в цех очистки.

Критерии оценки по вопросам знаний, умений и навыков биотехнолога

- Поиск и отбор продуцентов ЛС.
- Применение различных способов ферментации при получении ЛС.
- Знание оборудования и условий проведения ферментации при получении ЛС.
- Знание методов контроля процесса ферментации.
- Определение подлинности целевого продукта.
- Количественная оценка целевого продукта.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО КУРСУ «БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

1. Существующие определения биотехнологии как науки и сферы производства. Биотехнология - одна из основ современной фармации.

2. Биотехнология как базовый этап и как один из промежуточных этапов получения лекарственного вещества. Биотехнологический процесс, полностью обеспечивающий получение целевого продукта.

3. Биосинтез и органический синтез - взаимодополняющие пути создания лекарств (на примере антибиотиков и гормонов).

4. Совершенствование биообъектов, используемых при производстве лекарственных и диагностических препаратов. Методы селекции.

5. Совершенствование биообъектов, используемых при производстве лекарственных и диагностических препаратов. Методы введения чужеродных генов: трансформация, трансдукция, конъюгация.

6. Условия, необходимые для высших организмов и микроорганизмов в биотехнологических системах при производстве лекарств. Системы жизнеобеспечения.

7. Слагаемые биотехнологического производства. Подготовительные и основные этапы производства.

8. Методы стерилизации технологического воздуха, оборудования и питательных сред в биотехнологическом производстве.

9. Термическая стерилизция питательных сред. Критерий Дейн- дорфера-Хэмфри .

10. Классификация промышленного биосинтеза лекарственных веществ по организации материальных потоков, по методам культивирования продуцентов, по роли целевого продукта в метаболизме продуцента.

11. Ферментационные аппараты (ферментеры). Системы регуляции процесса.

12. Особенности выделения целевых продуктов из культуральной жидкости, отличающие процесс от выделения целевых продуктов при органическом синтезе.

13. Центрифугирование и сепарирование в биотехнологическом производстве. Виды центрифуг. Виды сепараторов. Специфика применения при работе с биообъектами и продуктами биосинтеза.

14. Методы фильтрования в биотехнологическом производстве. Специфика, связанная с биообъектами и параметрами культураль-

ных жидкостей. Предварительная обработка культуральных жидкостей. Фильтр-прессы. Листовые фильтры.

15. Мембранные методы разделения в биотехнологическом производстве. Микрофильтрация. Электродиализ. Обратный осмос. Ультрафильтрация.

16. Методы сушки применительно к биообъектам и продуктам биосинтеза. Распылительные «сушилки». Сублимационные «сушилки». Физические явления в клетке при замораживании.

17. Методы инженерной энзимологии в производстве лекарственных препаратов. Преимущества использования иммобилизованных биообъектов при выделении и очистке лекарств.

18. Иммобилизация ферментов и целых клеток биообъектов в биотехнологическом производстве. Экологические и экономические преимущества.

19. Методы иммобилизации ферментов и целых клеток. Примеры использования иммобилизованных биообъектов в медицинской промышленности.

20. Иммобилизация ферментов и клеток-продуцентов лекарственных веществ. Общие сведения об устройстве биореакторов разных типов.

21. Биотехнологическое получение ЛС на основе культур растительных клеток. Тотипотентность. Преимущества использования клеточных культур.

22. Методы культивирования растительных клеток. Каллусные и суспензионные культуры. Иммобилизация растительных клеток.

3. Суспензионное культивирование растительных клеток: параметры биообъекта, требующие учета; аппараты для культивирования.

24. Растительные клетки. Применение в биотехнологическом процессе для трансформации лекарственных веществ.

25. Правила GMP и их значение для производства лекарственных препаратов. Особенности GMP в случае биотехнологического производства.

26. Правила GMP при производстве биотехнологических лекарственных препаратов. Причины существования международных, региональных и национальных правил GMP.

27. Правила GMP и фармакопейные статьи. Их взаимодополняемость.

28. Перечень основных разделов в своде правил GMP. Значение отдельных разделов.

29. Правила GLP и GCP при испытании новых лекарственных веществ (на примере антибиотиков).

30. Биотехнология аминокислот. Химико-энзимотический метод получения. Микробиологический синтез.

31. Внутриклеточная регуляция биосинтеза аминокислот и пути интенсификации этого процесса в производстве.

32. Конструирование штаммов-продуцентов аминокислот и пути интенсификации процесса путем оптимизации условий ферментации.

33. Получение витаминов и коферментов методами биотехнологии. Производство витамина B_{12}♠. Продуценты. Генно-инженерный штамм.

34. Производство витамина B_2♠. Продуценты. Генно-инженерный штамм.

35. Производство аскорбиновой кислоты. Сочетание этапов химического синтеза и биоконверсии. Микроорганизмы, осуществляющие биоконверсию в различных схемах получения аскорбиновой кислоты. Этап перевода D-сорбита в L-сорбозу.

36. Получение витамина РР*. Продуценты НАД. Пути повышения выхода целевого продукта.

37. Продуценты эргостерина[р], β-каротина♠, убихинонов. Биотехнологические схемы получения.

38. Микробиологическая трансформация стероидов при создании лекарственных стероидных препаратов.

39. Физиологическая целесообразность биопревращений стероидных соединений.

40. Биоконверсия стероидов. Биообъекты, используемые для процессов 11-гидроксилирования, 1, 2-дегидрирования, отщепления боковой цепи.

41. Микробиологический синтез гидрокортизона и получение из него преднизолона путем биоконверсии.

42. Продуценты антибиотиков. Среда обитания. Методы выделения.

43. Биологическая роль антибиотиков. Причины их позднего накопления в ферментационной среде по сравнению с накоплением биомассы продуцента.

44. Общие данные о биосинтезе антибиотиков. Предшественники β-лактамных антибиотиков, аминогликозидов, эритромицина, тетрациклина.

45. Мультиферментные комплексы в клетках продуцентов антибиотиков.

46. Регуляция биосинтеза антибиотиков. Углерод- и азоткатаболитная регуляция. Ингибирование по типу обратной связи (ретроингибирование).

47. Плесневые грибы - продуценты антибиотиков. Основные особенности строения клетки и цикла развития при ферментации. Антибиотики, образуемые грибами.

48. Антибиотики и другие БАВ, образуемые грибами. Общие данные об их химической структуре и применении. Свойства продуцентов.

49. Актиномицеты - продуценты антибиотиков. Особенности строения и цикла развития при ферментации. Антибиотики, образуемые актиномицетами.

50. Бактерии (эубактерии) - продуценты антибиотиков. Строение клетки. Антибиотики, образуемые бактериями.

51. Полусинтетические антибиотики. Биосинтез и оргсинтез при создании полусинтетических антибиотиков (примеры).

52. Механизмы резистентности к β-лактамным антибиотикам. Новые β-лактамные антибиотики, эффективные против резистентных форм бактерий. Целенаправленная трансформация.

53. Механизмы развития резистентности к аминогликозидным антибиотикам. Новые эффективные аминогликозиды. Целенаправленная трансформация.

54. Липосомальные лекарственные формы антибиотиков. Преимущества перед традиционными формами. Методы получения.

55. Природные источники генов резистентности к антибиотикам. Организационные мероприятия как один из путей борьбы с антибиотикорезистентностью.

56. Препараты нормофлоров: колибактерин♠, бифидумбактерин♠, лактобактерин♠, бификол♠. Свойства. Цель применения. Микроорганизмы, служащие основой препаратов.

57. Молочнокислые бактерии. Механизмы подавляющего действия на патогенные и гнилостные бактерии. Другие функции, благоприятные для организма человека. Препараты на основе молочнокислых бактерий.

58. Препараты на основе живых культур микроорганизмовсимбионтов. Значение при дисбактериозах.

59. Рекомбинантные белки. Конструирование и особенности культивирования микроорганизмов-продуцентов чужеродных для них белков.

60. Очистка рекомбинантных белков, полученных путем микробиологического синтеза. Специфические примеси в конечном продукте: контроль и удаление.

61. Инсулин. Источники сырья. Рекомбинантный инсулин человека. Причины получения путем микробиологического синтеза. Схема производственного процесса.

62. Конструирование штаммов-продуцентов инсулина человека. Преимущества кишечной палочки как продуцента.

63. Иммунобиотехнология ЛС.

64. Моноклональные антитела. Получение и применение.

65. ИФА. Принцип метода. Гомогенный и гетерогенный ИФА. Области применения. Преимущества.

66. Вакцины. Классификация. Характеристика каждого отдельного типа вакцин: живые, инактивированные, субъединичные, ДНК-вакцины.

67. Особенности технологии получения вакцин. Контроль специфической активности. Хранение.

КРАТКИЙ ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ-СПРАВОЧНИК С КОММЕНТАРИЯМИ

А

Автокатализ - механизм «размножения» катализатора, в рамках которого образовавшийся катализатор активирует каталитически неактивный предшественник (например, система трипсиноген- трипсин).

Автолиз - самораспад (лизис) клеток микроорганизмов под действием внутриклеточных гидролитических ферментов.

Автолизины - термин, включающий все гидролазы пептидогликана бактерий.

Агар - смесь полисахаридов, получаемых из красных морских водорослей. После расплавления и охлаждения образует плотный гель, в микробиологии используют в качестве основы для питательных сред.

Агглютинация - агрегация клеток, суспензированных в жидкости под действием какого-либо агента.

Агонист - соединение (часто гормон или его аналог), которое связывается с рецептором и вызывает аналогичное гормону действие.

Аденин - пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу, является одним из четырех азотистых оснований, входящих в

состав РНК и ДНК.

Активный транспорт - энергозависимый транспортный механизм, осуществляющий транспорт веществ против градиента концентрации.

Актиномицеты - многоклеточные бактерии со сложным циклом развития.

В литературе можно встретить старинное и неправильное название актиномицетов - «лучистые грибы». Среди почвенных актиномицетов часто встречаются штаммы-антагонисты, т.е. продуценты антибиотиков.

Альфа-спираль (α-спираль) - элемент вторичной структуры белка, правозакрученная спираль полипетидной цепи, в которой каждый амидный атом азота образует водородную связь с карбонильной группой аминокислоты.

Аллель - один из двух (или нескольких) структурных форм гена.

Альгинат - полисахарид, синтезируемый различными водорослями, состоящий из остатков β-D-маннуроната и a-L-гулуроната.

Амбисом^{р} - липосомальный препарат антифунгального антибиотика амфотерицина В, используемый при лечении системных микозов, обладает пониженной токсичностью по сравнению со «свободным» амфотерицином В.

Амикацин - полусинтетический аминогликозидный антибиотик на основе канамицина, не подвергается инактивации защитными ферментами (трансферазами, фосфотрансферазами, ацетилтрансферазами), резистентных к аминогликозидам штаммов бактерий независимо от того, на какие функциональные группы действуют эти ферменты.

Аминоацил-тРНК - молекула транспортной РНК, к 3-концу которой присоединена специфическая аминокислота.

Аминокислота - мономерная единица («строительный блок») белковых молекул.

6-Аминопенициллановая кислота (6-АПК) - бициклическое ядро пенициллиновой молекулы, получаемое в биотехнологической промышленности из бензилпенициллина путем ферментативного отщепления радикала при C_6 атоме. Служит ключевым соединением для получения новых (полусинтетических) пенициллинов, нечувствительных к β-лактамазам, обладающих более широким спектром действия, реагирующих с другим пенициллинсвязывающим белком и т.п. Получение новых пенициллинов основано на химическом или ферментативном замещении свободной аминогруппы в 6-АПК.

7-Аминоцефалоспорановая кислота (7-АЦК) - бициклическое ядро цефалоспорина С^{р}, получаемое в биотехнологической промышленности химическим или ферментативным путем. На его основе методом ферментативного синтеза получают ряд полусинтетических цефалоспоринов (цефалотин, цефазолин, цефалоридин, цефоперазон и др.).

7-Аминодезацетоксицефалоспорановая кислота - ключевое соединение для получения ряда полусинтетических цефалоспоринов (цефалексин, цефрадин и др.), которое, в отличие от 7-АЦК, получают не из цефалоспорина C^p, а из бензилпенициллина.

Амплификация - увеличение количества какого-либо биохимического агента (например, увеличение количества ДНК с помощью

ПЦР).

Анабиоз - состояние организма, характеризующееся почти полным, но вместе с тем обратимым прекращением жизнедеятельности.

Одна из форм приспособительных реакций микроорганизмов к крайне неблагоприятным условиям внешней среды.

Анаболизм - энергопоглощающий путь метаболизма, приводящий к синтезу макромолекул или их составных частей (гликонеогенез, синтез жирных кислот).

Антагонист - соединение (часто аналог гормона), которое связывается с рецептором, но не вызывает физиологического эффекта (см. «Агонист»).

Анатоксины (токсоиды) - инактивированные формалином, но сохранившие антигенность бактериальные токсины (например, дифтерии и столбняка).

Анаэробные микроорганизмы - микроорганизмы, растущие при отсутствии кислорода.

Антибиоз - термин, введенный в литературу в 1890 г. и используемый для обозначения явления микробного антагонизма между грибами и бактериями, а также между различными видами бактерий.

Антивитамины - вещества, не обладающие свойствами витаминов, но близкие к ним по химической природе.

• В основе действия антивитаминов лежит вытеснение соответствующего витамина из его комплекса в ферментативной системе. В результате образуется неактивный фермент, нарушается обмен веществ и возникает тяжелое заболевание.

• Примером антивитаминов являются сульфаниламидные препараты, близкие по химической структуре к парааминобензойной кислоте (предшественник фолиевой кислоты).

• Антибиотик - термин, введенный в литературу З. Ваксманом в 1941 г., значение которого трансформировалось на протяжение многих лет.

• Первоначальное значение антибиотика как «начала, противодействующего жизни», основано на использовании термина позапрошлого века («антибиоз», «антибиот»). По З. Ваксману, антибиотик - химическое вещество, образуемое микроорганизмами, подавляющее рост и разрушающее другие бактерии и микроорганизмы, даже находясь в

разбавленных растворах (последним подчеркивалась высокая антимикробная активность антибиотика).

В настоящее время понятие «антибиотик» усложнилось и расширилось. К антибиотикам относят низкомолекулярные химические структуры, являющиеся вторичными метаболитами микроорганизмов (т.е. образующиеся в определенной фазе роста

культуры). Антибиотики не только подавляют рост микроорганизмов, но и считаются сигнальными молекулами, участвующими в перестройке метаболизма своего продуцента при изменении питательной среды (например, при отсутствии в ней источников углерода, азота, фосфора).

• Некоторые исследователи считают антибиотики «факторами преодоления стрессовых ситуаций для их продуцента», что имеет важное значение для биотехнолога в отношении подбора питательных сред для интенсификации биосинтеза антибиотиков.

• Антибиотики не являются продуктами матричного синтеза, поэтому получение их методами генной инженерии затруднено в настоящее время, так как в сборке молекулы антибиотика из первичных метаболитов, как правило, участвуют 10-20 ферментов и соответственно генный инженер должен оперировать 10-20 генами.

Антибиотики полусинтетические - производные природных антибиотиков, получаемые путем химической трансформации, а также антибиотические структуры, при получении которых сочетаются методы как химической, так и биологической трансформации. Это цефалоспорины, пенициллины, макролиды, аминогликозиды, рифамицины, антрациклины, тетрациклины и т.д.

Антиген - генетически чужеродное вещество, образуемое другим видом организма, взаимодействующее со специфическими рецепторами Т- и В-лимфоцитов и вызывающее иммунный ответ - выработку антител.

Антиген - вещество, стимулирующее любую форму иммунного ответа. Обычно в роли антигена выступают чужеродные частицы (клетки, бактерии и др.) или крупные молекулы (белки, полисахариды) чужеродного организма, но в ряде случаев мелкие молекулы (гаптены) и даже собственные компоненты организма могут быть антигенами. Основное, далеко не единственное условие антигенности - наличие поверхностных структур, генетически отличных от тканей организма-хозяина.

Антисыворотка - жидкая составляющая крови, содержащая антитела.

Антитело - белок (иммуноглобулин), синтезируемый В-лимфоцитами в ответ на проникновение в организм различных антигенов (генетически чужеродных антигенных структур) и специфически с ними взаимодействующий.

Антитела - сывороточные глобулины. Обладают свойством специфически связываться с антигеном, активировать комплемент, усиливать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрализовать бактериальные токсины.

Антикодон (триплет) - содержится в каждой транспортной РНК и специфически взаимодействует в рибосомно-матричной системе с определенным кодоном (триплетом) матричной РНК.

В результате этого взаимодействия аминокислотная цепь синтезируемой полипептидной цепи соответствует последовательности кодонов в матричной РНК, в соответствии с чем на стадии трансляции происходит передача генетического кода.

«Антисмысловая» РНК - РНК-последовательность, комплементарная либо какому-то участку, либо всей молекуле специфической матричной РНК.

Апоптоз - запрограммированная гибель части популяции клеток многоклеточного организма. Общебиологическое явление, отвечающее за поддержание необходимого и достаточного количества клеток, элиминацию клеток, ненужных на данной стадии онтогенеза. Морфологически апоптоз проявляется уплотнением ядерного хроматина с более поздним распадом ядра на фрагменты и образованием апоптозных телец, подвергающихся фагоцитозу.

Ультраструктурные изменения в клетке при некрозе значительно отличаются от изменений при апоптозе. В аспекте фармации важен поиск агентов как избирательно тормозящих процессы, включенные в апоптоз (например, в случае болезни Альцгеймера, т.е. при старческой дегенерации нейронов), так и стимулирующих апоптоз (например, в случае опухолевых клеток или клеток с внутриклеточными паразитами). Последние (например, хламидии) могут продуцировать ингибиторы апоптоза для предотвращения гибели клетки.

Аттенуированная (ослабленная) вакцина - вакцина, приготовленная с использованием ослабленных различными способами микроорганизмов.

Ауксин - специфический фактор роста растительной клетки, а также регулятор синтеза вторичных метаболитов растений - производных индолилуксусной кислоты (индолил-3-уксусная кислота, нафтилуксусная кислота и др.).

Аутоиммунные заболевания - заболевания, вызванные реакцией иммунной системы, при которых происходит синтез антител к собственным белкам (например, ревматоидный артрит).

Аутологичные клетки - клетки, взятые из организма-донора, культивированные (при необходимости генетически модифицированные) и затем вновь введенные в организм-донор.

Аутосома - любая хромосома, не являющаяся половой. В соматических клетках человека присутствует 22 пары аутосом и 1 пара половых хромосом.

Аэробные микроорганизмы - микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

Б

Бактериофаг - вирус, инфицирующий бактерии.

Бактериоцин - вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и убивающее клетки другого микроорганизма.

Белок теплового шока - белок, продуцируемый некоторыми клетками как результат воздействия температуры.

Бета-клетки (В-клетки) - лимфоциты, продуцирующие антитела и происходящие из клеток костного мозга.

Бета-структура (β-структура, β-складка, β-тяж) - элемент вторичной структуры белка, в котором амидный атом азота одной части полипептида образует водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы другой части полипептида.

Бинарная векторная система - двухплазмидная система *Agrobacterium,* предназначенная для переноса участка Т-ДНК, несущего клонированные гены, в растительные клетки. Гены вирулентности локализованы на одной плазмиде, а встроенный участок Т-ДНК - на другой.

Биодеградация - разрушение загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов.

Биомасса: 1) клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов; 2) органическое вещество, которое может быть использовано как источник энергии или химическое вещество.

Биосенсор - биоэлектронное аналитическое устройство, преобразующее концентрационный сигнал в электрический в режиме реального времени.

Блоттинг - перенос разделенных молекул из одной среды (например, геля) на твердый носитель (бумагу, нитроцеллюлозный фильтр).

Биообъект - средство производства для получения лекарственных, профилактических, диагностических препаратов, может суще-

ствовать как организм или фермент (промышленный биокатализатор).

Биотрансформация - процессы микробных (ферментативных) превращений веществ в определенные продукты, структура которых родственна структуре исходных веществ. При этом полной деградации субстрата не происходит, а наступают лишь незначительные изменения, которые часто приводят к получению продукта с ценными практическими свойствами.

Блок-мутант - мутант, получаемый из продуцента антибиотика, лишенный способности синтезировать определенный фрагмент антибиотической молекулы.

Внесение этого фрагмента в питательную среду влечет за собой включение его в молекулу антибиотика (в среду могут вноситься также и производные указанного фрагмента). В

качестве примера можно привести аминогликозидные антибиотики с модификациями аминоциклитольного остатка в их молекуле.

В

Ваксман Зелман (1888-1973) - американский микробиолог и эколог, специализировавшийся на изучении почвенных биоценозов. Особенно много внимания он уделял актиномицетам и продуцируемым ими антибиотикам. Открыл в первой половине 40-х годов XX века стрептомицин, а затем ряд других антибиотиков. Лауреат Нобелевской премии.

Вакцины - препараты, предназначенные для создания активного искусственно приобретенного иммунитета с целью профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Основные требования к вакцинным препаратам: высокая или умеренная иммуногенность, безопасность, низкая реактогенность, стабильность при хранении, стандартизуемость, возможность включения в ассоциированные вакцины.

Валидация - термин, использующийся в GMP, означающий особенно тщательную и многостороннюю проверку технологии в целом или части технологической цепочки на производстве.

В отношении биотехнологического производства ЛС валидацию проводят, в частности, при замене штамма-продуцента целевого продукта (даже если это более продуктивный штамм, являющийся мутантом ранее использовавшегося). При замене состава питательной среды (при ее совершенствовании), так как и в том, и другом случае

могут образоваться новые вещества, которые при использовании исходной технологии окажутся примесью в конечном препарате.

Вариабельные домены - участки полипептидных цепей иммуноглобулина, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул различных иммуноглобулинов и отвечающие за антигенную специфичность последних.

Вектор - часть рекомбинантной ДНК, обеспечивающая ее проникновение в клетку и репликацию в этой клетке. Вектор конструируют на основе плазмид, фагов, космид.

Вирион - внеклеточная, покоящаяся форма вирусной частицы.

Вирион выполняет функцию переноса генома вируса из одной клетки в другую или из одного организма в другой.

Вирулентность - характеристика патогенности микроорганизма, свойственна только грамотрицательным бактериям.

Витамины - низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, абсолютно необходимые в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности организма человека и животных. В природе источником витаминов

являются главным образом растения и микроорганизмы. Методами биотехнологии получают витамины A_1♠, D♠, C♠, B_{12}♠, B_2♠ и убихинон-Q_{10}.

Внешняя мембрана - компонент оболочки грамотрицательных бактерий, отделенный от клеточной стенки периплазматическим пространством. Наружная поверхность внешней мембраны состоит из полисахаридов и соприкасается со средой, а внутренняя поверхность состоит из фосфолипидов и обращена в периплазматическое пространство. Внешнюю мембрану пересекают пориновые каналы.

Внешняя мембрана определяет природную резистентность некоторых видов грамотрицательных бактерий к некоторым антибиотикам.

• Локализованный на наружной поверхности внешней мембраны липид А вместе с присоединенными к нему полисахаридными цепями является эндотоксином, играющим важную роль в патогенезе инфекций, также липид А служит объектом воздействия

ЛС.

Время генерации - время, за которое в популяции одноклеточных организмов удваивается число клеток. Называется также временем удвоения.

Вторичный метаболит - вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в

стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).

Вторичная структура белка - регулярные элементы структуры белковой молекулы, такие, как α-спирали, β-листы.

Г

Гаплоид - термин, характеризующий организм (клетку), у которого имеется один набор хромосом.

Гаптен - низкомолекулярное вещество, само по себе не обладающее антигенной активностью, которое, однако, при присоединении к макромолекуле приобретает это свойство.

Гаузе Г.Ф. (1910-1985) - биолог-эволюционист. На рубеже 30-х годов XX века совместно с М.Г. Бражниковой выделил из московской почвы штамм спорообразующей бактерии, продуцирующей антибиотик грамицидин С («грамицидин Советский»), который был изучен и испытан в полевых условиях госпитальной службы во время Второй мировой войны. С 1960 по 1985 г. - директор Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. Под его руководством были открыты и внедрены в практику антибиотики из группы аминогликозидов и гликопептидов, а также блеомицин, оливомицин.

Гель-фильтрация - способ разделения веществ (бактериальных полисахаридов, очищенного агар-агара, ПААГ) по размеру их молекул, основанный на использовании молекулярных сит.

Ген - единица наследственности. Участок ДНК, содержащий специфическую для каждого гена последовательность нуклеотидов.

• Эта последовательность транскрибируется («переписывается») в последовательность нуклеотидов матричной (информационной) РНК. На этой матрице в рибосомной системе синтезируется белок с последовательностью аминокислот, исходно обусловленной последовательностью нуклеотидов в гене. От последовательности нуклеотидов в гене зависит конкретная последовательность аминокислот в белке, а от последней зависит функция самого белка.

• «Существенность гена» означает обязательность функционирования гена в данных условиях существования организма. Ряд генов у патогенных микроорганизмов могут быть существенными при инфицировании макроорганизма и несущественными при культивировании *in vitro.*

• Индукция гена - связывание с индуктором белка-репрессора и создание возможности экспрессии (транскрипции и трансляции гена).

Генетика - наука о наследственности и изменчивости.

В период с начала до середины XX века, когда материальная структура гена еще не была установлена, генетика характеризовалась как формальная наука (генетика символов). Ее основу составляют классические законы Г. Менделя. Молекулярная генетика стала развиваться с начала 50-х годов XX века после установления Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК как двойной спирали и решения вопроса о природе гена.

Генная иммунизация - индукция иммунного ответа у организма без введения антигена путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

Геномика - новая генетическая дисциплина, возникшая в конце XX века с целью познания генома, т.е. всей совокупности генов в организме.

Возникновение геномики стало возможным после автоматизации работ по секвенированию генов - установлению полной последовательности нуклеотидных пар в них, компьютерной обработки полученных данных и создания международных баз данных геномных исследований. Геномику принято дифференцировать на структурную (установление полной последовательности нуклеотидных пар в гене, хромосоме/хромосомах); сравнительную (установление степени близости по последовательности нуклеотидов в генах, полученных из разных источников); функциональную (определение функций белка, кодируемого каждым отдельным геном и роли этого белка в метаболизме). Применительно к фармации геномика позволяет выявлять новые гены-мишени для действия ЛС (точнее новые гены, с продуктами которых могут взаимодействовать лекарства, проявляющие таким образом свою

активность). Поиск и отбор новых ЛС начинается с оценки действия новых структур не на организм, культуру клеток или суммарный биохимический процесс, а на отдельный ген (кодируемый им продукт). Вначале исследователь согласно базам данных получает представление о роли кодируемого геном белка в метаболизме, далее с помощью ПЦР нарабатывает ДНК этого гена, на ней, как на матрице, нарабатывается мРНК, а затем в рибосомной системе синтезируется белок - специфический продукт избранного гена. Далее создают бесклеточную систему, где функционирует указанный продукт. На этой системе испытывают природные и синтетические структуры - предполагаемые эффекторы функций гена. Структуры, заинтересовавшие исследователя, испытывают в даль-

нейшем на культурах клеток в целостном организме. Такой путь отбора БАВ получил жаргонный термин «метод обратной генетики», т.е. когда исследования проводят не от организма к гену, а от гена к организму.

Генотип - генетическая конструкция организма, набор всех его аллелей.

Гетерозигота - организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей.

Гибридома - гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту *in vitro* и синтезу моноклональных антител.

Гомозигота - организм, в одном или нескольких локусах генома которого имеются идентичные аллели.

Гомологичные хромосомы - хромосомы, включающие идентичные наборы генов, одинаково расположенных друг относительно друга. Образуются в результате дупликации пар родительских хромосом.

Гуанин - пуриновое основание, комплементарное цитозину. Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК и ДНК.

Д

Дезоксирибоза - пятиуглеродный моносахарид, входящий в состав ДНК.

Дезоксирибозим - молекула ДНК, обладающая каталитической активностью.

Декстран - разветвленный полисахарид микробного происхождения.

Диализ - техника отделения макромолекул от низкомолекулярных веществ путем диффузии последних через полупроницаемую мембрану, например через целлофан.

Диплоид - организм, клетки которого содержат два гомологичных набора хромосом.

Дисульфидная связь - ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в молекулы цистеина. Стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

Домен - участок полипептидной цепи, выполняющий определенную функцию (например, цитоплазматический домен, трансмембранный домен и т.д.).

Е

Емкость вектора - максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

И

Индукция фермента - относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление в среде индуктора (индукция фермента связана с индукцией гена, кодирующего этот фермент).

Инициация - начало синтеза биополимера.

Инокулятор - небольшой ферментер для стерильного выращивания посевного материала (инокулята), обычно это герметичная емкость с мешалкой, барботером и терморубашкой.

Ионный канал - трансмембранный белок, облегчающий транспорт определенных ионов.

Интерлейкины - большая группа белков (ИЛ-1-ИЛ-18), включенных в системы передачи сигналов при иммунном ответе (этот термин близок терминам «лимфокины» и «цитокины»).

Интерфероны - группа белковых молекул, вырабатываемых клетками крови организма в ответ на введение вирусов и вирусных антигенов. С помощью интерферонов клетки иммунной системы обмениваются информацией (сигналами), а также обеспечивают защиту организма от вирусных инфекций.

Интроны - участки гена эукариот, которые транскрибируются, но затем в зрелую мРНК не включаются, в отличие от экзонов.

К

Капсид - белковая оболочка вирусной частицы.

Картирование генов - определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов.

Каскад - серия ферментативных реакций, когда на каждой стадии происходит превращение неактивного фермента в активный.

Каспазы - семейство цистеиновых протеаз, участвующих в апоптозе. В нормальной клетке они находятся в неактивном состоянии. Для их активации необходимы апоптозные шапероны - белки, меняющие конформацию других белков. Активированные каспазы участвуют в деструкции клетки.

Катаболитная репрессия - явление «глюкозного эффекта», заключающееся в том, что глюкоза как наиболее быстро усваиваемый суб-

страт вызывает разной силы, но постоянную репрессию катаболических ферментов.

В биотехнологическом производстве может отрицательно влиять на синтез целевых продуктов (вторичных метаболитов).

Катионный белок нейтрофилов (BPI) - белок с молекулярной массой 55 кДа, нейтрализующий эндотоксин грамотрицательных бактерий (вследствие сродства к липиду А в липополисахариде внешней мембраны) и нарушающий молекулярную организацию цитоплазматической мембраны бактерий.

Кетолиды - полусинтетические антибиотики, производные эритромицина, характеризуются отсутствием L-кладинозы при 3-м углеродном макроциклического лактона и наличием вместо нее кетогруппы. Представители кетолидов (например, телитромицин) недавно внедрены в лечебную практику.

Клавулановая кислота - β-лактамная структура, в которой сера в пятичленном кольце заменена на кислород.

Образуется штаммами *Streptomyces clavuligerus.* Очень слабо связывается с транспептидазами пептидогликана, т.е. является малоактивным антибиотиком. Необратимо реагирует с активным центром ряда β-лактамаз и инактивирует их. Комбинируется с амоксициллином и защищает его от ферментативной инактивации (препараты амоксиклав*, аугментин*).

Клеточная линия - популяция клеток, поддерживаемая в культуре путем многократных пересеваний.

Клетки миелоидного ряда - фагоциты костно-мозгового происхождения, в том числе нейтрофилы, эозинофилы и моноциты.

Клон - генетически однородное потомство одной клетки.

Пример: колония, возникшая при рассеве суспензии клеток микроорганизма на твердой питательной среде. При пересевах клоновой культуры в ней могут появиться «варианты», поэтому клоновую культуру как штамм поддерживают отбором по специфическим признакам.

Клонирование генов - система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какоголибо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

Кодон - последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту.

Кодон-терминатор - полинуклеотидный триплет, сигнализирующий об окончании синтеза белка с С-конца.

Комплемент - белковый комплекс сыворотки крови, одна из составляющих врожденного иммунитета. Принимает участие в регуляции воспалительных процессов, активации

фагоцитоза и литическом действии на клеточные мембраны. Активация комплемента происходит в результате взаимодействия его компонентов с иммунными комплексами.

Комплементарные нуклеотидные последовательности - полинуклеотидные последовательности, которые взаимодействуют между собой в соответствии с правилами спаривания оснований: аденин (А) образует пару с тимином (Т) [или урацилом (U) в РНК], гуанин - с цитозином (С).

Константа Михаэлиса (Км) - кинетический параметр ферментативной реакции, численно равный концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Характеризует сродство фермента к субстрату. Чем ниже Км, тем прочнее связывание между субстратом и ферментом.

Конъюгат - химическая структура, в которой за счет ковалентной связи соединены две молекулы с разными функциями. Например, конъюгаты цефалоспоринов с фторхинолонами соединены сложной γ-эфирной связью. В микробной клетке эта связь расщепляется, и каждая из двух молекул реагирует со своей мишенью.

Конъюгативные плазмиды - плазмиды, способные к переходу из клетки в клетку. Имеют гены, детерминирующие перенос плазмиды в другую клетку путем конъюгации. Количество таких генов около 20.

Конъюгация - процесс генетического обмена, обусловленный переносом генетической информации от клетки донора в клетку реципиента при непосредственном контакте клеток друг с другом (у некоторых микроорганизмов это аналог полового процесса).

Космида - легко проникающая в клетку плазмида, несущая cos-участок (липкие концы ДНК фага R) и являющаяся вектором с высокой емкостью.

Коферменты - многие ферменты (двухкомпонентные ферменты) оказывают каталитическое действие на субстраты только в присутствии специфического низкомолекулярного органического соединения - кофермента. Многие витамины и их производные в биохимических реакциях участвуют как коферменты. Именно поэтому их поступление в организм с пищей обязательно.

Коферментация - одновременный рост двух микроорганизмов в одном биореакторе.

Ксенобиотик - соединение, полученное искусственным путем, а не синтезированное живым организмом.

Кукурузный экстракт - частый компонент ферментационной среды при выращивании микроорганизмов в промышленных целях. Содержит широкий набор аминокислот и витаминов, а также большое количество молочной кислоты.

Культуральная среда - твердая или жидкая среда, использующаяся для выращивания микроорганизмов *in vitro.*

Л

Лидерная последовательность - нетранслируемая последовательность мРНК, расположенная между 51 концом и инициирующим кодоном AUG.

Лигаза - фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, что позволяет восстанавливать за счет ковалентной связи углеводно-фосфатный «хребет»

ДНК.

Лизис - разрушение клеточных стенок под действием содержащихся в лизосомах ферментов или других различных агентов, например бактериофагов, антибиотиков.

Лизосома - клеточная везикула, содержащая гидролитические ферменты, активируемые при низком значении pH.

Лизоцим - фермент, катализирующий расщепление гликозидной связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридных «хребтах» пептидогликана (муреина) бактерий.

Лизоцим был открыт в носовой слизи А. Флемингом в начале 1920-х годов.

• Лизоцим нашел применение в клеточной инженерии при получении протопластов, а также его используют при консервировании пищевых продуктов.

Локус - местонахождение на хромосоме специфического гена.

Лимфокины - относящиеся к иммуноглобулинам молекулы, образуемые лимфоцитами. Включены в системы передачи сигналов между клетками иммунной системы.

Лиофильное высушивание (лиофилизация) - метод высушивания целевого продукта из замороженного состояния под вакуумом.

• В биотехнологии лиофильное высушивание широко используют для длительного хранения культур микроорганизмов, живых вак-

цин, плазмы, сыворотки крови и ее препаратов, образцов исследуемого материала и др. без существенного изменения исходных свойств.

• Преимущество лиофильного высушивания перед высушиванием из водных растворов или суспензий состоит в том, что после сублимации формируется сухая пористая масса, лишенная свободной воды и сохранившая объем и структуру исходного вещества.

Липкие концы - взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы, образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных

ДНК.

Липополисахарид - соединение, содержащее липид, связанный с полисахаридом. Один из компонентов клеточной стенки бактерий.

Липопротеин - комплекс липидов с белком, обеспечивающий транспорт липидов в крови.

Липосома - пузырек, образуемый одноили двухслойной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофобная часть этих молекул обращена внутрь пузырька, гидрофильная - наружу. Внутри пузырька могут находиться нуклеиновые кислоты, лекарственные вещества и т.д., адресно доставляемые липосомой.

М

Макромолекула - полимер с молекулярной массой от нескольких тысяч до сотен миллионов дальтон (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и т.д.).

Макрофаги (А-клетки) - крупные лейкоциты, обладающ

ие способностью к фагоцитозу и кооперации с Т- и В-лимфоцитами. Макрофаги первыми контактируют с антигеном, перерабатывают его и, взаимодействуя с Т-лимфоцитами, передают информацию об антигене В-лимфоцитам.

Маркерный ген - ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотику, ферментативная активность и т.д.).

Меласса - отход сахарного производства, содержащий около 50% сахаров, широко используемый в качестве источника углерода в микробиологическом производстве.

Мечников И.И. (1845-1916) - русский биолог, лауреат Нобелевской премии. Открыл явление фагоцитоза, ввел соответствующую тер-

минологию (фагоциты, фагоцитоз). Организовал в России первую бактериологическую станцию в г. Одессе. Его наблюдения за метаболизмом кишечной микрофлоры легли в основу разработанной им концепции борьбы с дисбактериозом кишечника (хроническое отравление человеческого организма продуктами метаболизма гнилостных бактерий) с помощью молочнокислых бактерий. Последнюю треть жизни работал во Франции в институте Л. Пастера, став одним из руководителей этого института и другом Л. Пастера.

Метаболическая перегрузка - нарушение метаболизма организмахозяина в результате введения в его геном и экспрессии чужеродной

ДНК.

Метод отпечатков - перенос колоний микроорганизмов с одной чашки Петри на другую с помощью бархатной «печатки» с полным сохранением взаимного расположения колоний.

Миелома - лимфома, образующаяся из В-лимфоцитов.

Митоз - клеточное деление, приводящее к образованию дочерней клетки с полным набором хромосом родительской.

Мицелий - вегетативное тело гриба, состоящее из тонких ветвящихся нитей.

Мобилизация - перенос неконъюгативных плазмид и хромосомных генов в другую клетку в виде коинтегратов с конъюгативными плазмидами.

Мониторинг - слежение за веществом при его выделении из природного субстрата, что позволяет осуществлять препаративные процедуры в нужном направлении. Слежение за циркуляцей вещества в организме позволяет получать фармакокинетические данные.

Моноклональные антитела - однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридомами - клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту.

Мурамовая кислота - эфир молочной кислоты и N-ацетил- глюкозамина, являющийся составной частью пептидогликана клеточной стенки бактерий. В пептидогликане от мурамовой кислоты ответвляются короткие пептидные цепочки - мурамилпептиды.

Мутант - организм с измененными вследствие мутации наследственными признаками.

Мутации - изменения генотипа, передающиеся по наследству.

• Нонсенс-мутация (бессмысленная мутация) - возникновение кодона, не кодирующего никакой аминокислоты, когда синтез белка прерывается.

• Миссенс-мутация - мутация, приводящая к замене одной аминокислоты в кодируемом белке на другую.

• Мутация внутригенная - последовательность оснований ДНК изменена в пределах одного гена.

• Мутация-транзиция - мутация в пределах одного гена, при которой происходит замена одного пурина на другой пурин или одного пиримидина на другой пиримидин.

• Мутация-трансверсия - мутация в пределах одного гена, при которой происходит замена пурина на пиримидин или пиримидина на пурин.

• Мутация спонтанная - причины неизвестны.

• Мутации индуцированные - мутации, возникающие после обработки культуры клеток мутагенами (физическими или химическими).

Мутасинтон - консервативный фрагмент молекулы антибиотика, модифицированный химическим путем, вносимый в среду, где культивируется блок-мутант, с целью образования мутасинтетического антибиотика.

ММутасинтез - получение с помощью блок-мутантов и мутасинтонов мутасинтетических антибиотиков.

Мутагенез *in vitro* - обработка мутагенами выделенного фрагмента ДНК («локализованный» мутагенез) с повышением вероятности мутаций конкретного гена

(частота мутаций может возрастать за счет использования высоких доз мутагена, которые не допустимы *in vivo,* так как могут привести к летальным мутациям).

Н

Навашин С.М. (1924-1998) - микробиолог, врач, лауреат Государственной премии. Возглавлял Всесоюзный научно-исследовательский институт по антибиотикам, которому принадлежит 90% опытно-промышленных регламентов производства антибиотиков в стране. Под его руководством был проведен цикл исследований по разработке методами инженерной энзимологии путей получения ключевых соединений для создания полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов.

Несовместимость плазмид - неспособность плазмид существовать стабильно в одной и той же клетке (плазмиды классифицируются по

группам несовместимости). Плазмиды одной группы могут быть несовместимы между собой и совместимы с плазмидами из других групп.

НК-клетки - нормальные (естественные) киллерные клетки. Популяция лимфоцитов, обладающих свойством распознавать и разрушать некоторые опухолевые и инфицированные вирусами клетки.

Нуклеозид - пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, ковалентно связанное с пятиуглеродным сахаром (пентозой).

Нуклеотид - нуклеозид, к которому по 5-углеродному атому сахарного кольца присоединена одна фосфатная группа или более.

N-конец - первая аминокислота (или несколько аминокислот) в белковой молекуле.

О

Обратная транскриптаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза, использующая молекулу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК.

Оболочка бактериальной клетки - термин, объединяющий внешнюю мембрану, клеточную стенку и внутреннюю плазматическую мембрану.

• В структуру оболочки грамотрицательных бактерий входит также периплазматическое пространство (между внешней и внутренней мембраной), имеющее структуру геля с пептидогликаном (собственно клеточная стенка).

• У грамположительных бактерий отсутствует внешняя мембрана, а клеточная стенка гораздо толще (многослойный пептидогликан), чем у грамотрицательных. Периплазматическое пространство не имеет четкого оформления, как у грамотрицательных бактерий, ввиду отсутствия внешней мембраны.

Окрашивание по Граму - метод окрашивания микробиологических препаратов, позволяющий идентифицировать две группы бактерий: грамположительные и

грамотрицательные. Основан на различии биохимического состава мембран бактериальных клеток.

Олигонуклеотид (олигомер) - короткий (6-10 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК. Обычно получают химическим путем.

Онкоген - ген, присутствующий в нормальной клетке, активация которого ведет к трансформации нормальной клетки в раковую.

Оператор - участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора, в него входит промотор - место «посад-

ки» РНК-полимеразы и место между промотором и структурным геном, на котором находится белок-репрессор.

Оперон - участок ДНК, содержащий несколько структурных генов, транскрибируемых с образованием одной полицистронной

мРНК.

Отжиг - процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК- ДНК или ДНК-РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

Открытая рамка считывания - последовательность нуклеотидов, не содержащая терминирующих кодонов, кодирует полипептид или белок.

П

Палиндром - сегмент двойной цепи полинуклеотида, в которой порядок оснований в одной цепи (читаемой от 5' к 3'-концу) тот же самый, что и в комплементарной антипараллельной цепи.

Парадигма - философский термин, используемый в естественных науках, в частности в биотехнологии. Означает концепцию, признаваемую всеми исследователями в данной области науки.

Изменение парадигмы («сдвиг» парадигмы) признается равноценным научно-технической революции в этой области.

Пастер Л. (1822-1895) - основатель научной биотехнологии, создал новые разделы химии, биологии и медицины, которые дали начало стереохимии, промышленной биотехнологии, медицинской микробиологии, вирусологии.

Паспорт культуры (штамма) - документ, в котором указывают основные сведения о культуре: название (род, вид), шифр, коллекционный номер, время и место выделения, морфологические, культуральные и биохимические признаки, данные о производственной ценности культуры и другие показатели.

Пассаж - пересев, перенос или пересадка клеток из одной культуральной среды в другую. Число пересевов клеток равно числу пассажей.

Пассивный иммунитет - вид иммунитета, возникающий при введении в организм сыворотки, содержащей антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации. Наблюдается также у новорожденных.

Пенициллиназа - фермент, расщепляющий β-лактамное кольцо пенициллина и некоторых других β-лактамных антибиотиков, обу-

словливает резистентность бактерий к пенициллину. Ген пенициллиназы в качестве гена-маркера применяют в генной инженерии при конструировании векторов и отборе рекомбинантных штаммов.

Пенициллиназа используется для проверки ампульных серий пенициллина на стерильность.

Пептид - короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями.

Пептидная связь - ковалентная связь между свободной карбоксильной группой при α-углеродном атоме одной аминокислоты и свободной карбоксильной группой при таком же атоме соседней аминокислоты в полипептидной цепи.

Пептидогликан - полимер, составляющий жесткую основу клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

• Пептидогликан, как гигантская сверхмолекула, охватывает всю клетку (пептидогликановый саккулюс) и содержит длинные полисахаридные нити, состоящие из перемежающихся остатков N-ацетилглюкозамина и мурамовой кислоты с отходящими от последней короткими пептидными цепочками. Цепочки параллельных полисахаридных нитей замыкаются и образуют поперечные (перекрестные) мостики, благодаря которым пептидогликан превращается в непрерывную сеть.

• Фермент транспептидаза пептидогликана, катализирующий замыкание пептидных цепочек, является мишенью для всех β-лактамных антибиотиков.

• Пептидогликановый слой у грамположительных бактерий толще, чем у грамотрицательных.

• Пептидогликан может быть гидролизован ферментом лизоцимом, при этом клетка гибнет (лизируется) из-за разницы в осмотическом давлении цитоплазмы и внешней среды. В среде с высоким осмотическим давлением (при содержании 20% сахарозы) из клетки, обработанной лизоцимом, формируется протопласт, обтянутый только цитоплазматической мембраной. Протопласты используют в клеточной инженерии для получения гибридных штаммов путем их слияния (фузии).

Первичная культура - культура клеток или тканей, взятых непосредственно от организма.

Первичная структура - последовательность аминокислот в белке.

Периодическое культивирование - сущность его заключается в том, что микроорганизмы выращивают в жидкой питательной среде в ферментере, в который за время культивирования не поступают компоненты питательной среды и не выводятся продукты обмена.

В этих условиях микроорганизмы растут и размножаются, проходя определенный цикл развития, который выражается в смене фаз и периодов.

• Различают шесть основных фаз роста: лаг-фазу (фаза приспособления), фазу ускорения (переходная), логарифмическую фазу (экспоненциальная), фазу замедления (уменьшение скорости роста), стационарную фазу и фазу отмирания (фаза гибели).

• Периодический способ выращивания микроорганизмов применяют на стадии получения посевного материала для многих производств, независимо от того, непрерывной или периодической будет основная стадия - ферментация.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата - культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени с периодическим добавлением субстрата и сбором целевого продукта только по завершении процесса.

Периплазматическое пространство - пространство в оболочке грамотрицательных бактерий между внешней мембраной и цитоплазмой.

Имеет структуру геля, в котором локализованы защитные системы микробной клетки, например β-лактамазы и ферменты, инактивирующие аминогликозидные антибиотики.

Пили - половые ворсинки на поверхности клетки донора, через которые в клетку реципиента переходит при конъюгации генетическая информация.

Пиримидины - один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот (тимин, цитозин, урацил).

Плазмида - внехромосомный генетический элемент, существующий в клетке отдельно от хромосом и автономно реплицирующийся. Построен так же, как и хромосома из 2-цепочечной ДНК.

Известны разные классы плазмид: однокопийные, многокопийные, кольцевые (замкнутые) и линейные. Размеры плазмид меньше, чем хромосом. Они могут содержать несколько десятков генов, в том числе гены антибиотикорезистентности. На основе плазмид конструируют векторы.

Пироген - вещество, продуцируемое бактериями и вызывающее повышение температуры у человека.

Поверхностное культивирование микроорганизмов - способ выращивания микроорганизмов на поверхности тонкого слоя твердой, сыпучей (рыхлой) или жидкой питательной среды.

Поливалентная вакцина - вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов или на разные эпитопы одной молекулы.

Полилинкер - короткий участок ДНК, содержащий несколько центров рестрикции. Вводится в вектор для последующего использования при включении нужных фрагментов ДНК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод, с помощью которого могут быть размножены *in vitro*фрагменты ДНК, в том числе отдельные гены. При этом используют олигонуклеотидные ДНК - зонды, комплементарные тем последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующие (четко обозначающие) границы гена, фрагмент которого должен быть размножен. Используется термостабильная ДНК-полимераза.

• Последовательность стадий: денатурация ДНК, отжиг зондов, синтез ДНК.

• Одна из задач ПЦР - обнаружение микроколичеств ДНК. Полинуклеотид - линейный полимер, состоящий из 20 нуклеоти-

дов и более, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК.

Полипептид - линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Полипептидом является, например, белковая молекула.

Полицистронная мРНК - молекула мРНК, кодирующая более одного белка. Образуется при трансляции двух соседних генов или более, входящих в состав одного оперона.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) - поверхностно-активное вещество, которое используют при слиянии (фузии) протопластов для усиления процесса.

«Помпы» - локализованные в цитоплазматической мембране системы активного энергозависимого выброса антибиотиков и других чужеродных для клетки веществ.

У грамотрицательных бактерий помпы состоят из трех компонентов: белок-ловушка, куда попадает через мембрану вещество; связующий белок (линкер); каналобразующий белок, пересекающий

периплазматическое пространство и внешнюю мембрану, через канал которого чужеродный агент возвращается в среду.

• У грамположительных бактерий системы активного выброса имеют менее сложную структуру.

• При работе помпы расходуется АТФ.

• Проблема поиска ингибиторов помпы с целью борьбы с антибиотикорезистентностью является очень актуальной. Так, например, неудачи противоопухолевой химиотерапии связаны с активным выбросом химиотерапевтических агентов. Для обозначения фенотипа таких клеток используют аббревиатуру MDR (multiple drug resistance).

Пориновые белки - компоненты структуры внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

• Триммеры пориновых белков формируют заполненные водой пориновые каналы, диаметр которых достаточен для проникновения через барьер внешней мембраны в периплазматическое пространство низкомолекулярных питательных веществ.

• Пориновые каналы классифицируют на катионоселективные и анионоселективные. Они могут осциллировать, т.е. находиться в закрытом или открытом состоянии. Через них в клетку проникают антибиотики со скоростью, определяемой размером молекулы, ее стереоконфигурацией и зарядом.

Праймер - олигонуклеотид, гибридизующийся с матрицей. Служит «затравкой» при ее размножении (копировании). Праймер - необходимый элемент при проведении ПЦР.

Прион - изоформа нормального белка нервной ткани с молекулярной массой 27-30 кДа, включенного в регуляцию циркадных ритмов активности и покоя, играющую роль в передаче нервных импульсов.

• Термин возник как анаграмма английских слов *(proteinaceus infections)* и означает белок с самоинфицирующей способностью.

Инфицирующий агент не содержит нуклеиновой кислоты, т.е. не является вирусом.

• Прион не является для человека чужеродным белком, поэтому иммунотерапия в этом случае неэффективна.

Прокариоты - микроорганизмы без оформленного ядра и митохондрий с генетической информацией в хромосоме, находящейся в цитоплазме клетки. Клетки прокариот по размеру значительно меньше, чем клетки эукариот.

Промотор - участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно находится перед 5-концом регулируемого гена.

Протеолиз - ферментативное расщепление белков.

Протопласт - микробная или растительная клетка, лишенная клеточной стенки. Оболочку составляет лишь цитоплазматическая мембрана. Протопласты стабильны только в гипертонической среде (например, в 20% сахарозе).

Профаг - ДНК бактериофага, интегрированная в геном бактериальной клетки-хозяина и реплицирующаяся вместе с ней.

Пурины - один из типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; к пуринам относятся аденин и гуанин.

Р

Рапамицин^{р} - иммуносупрессор макролидной структуры, образуемый *Streptomyces hygroscopicus.*Рапамицин^{р} действует на более поздний этап ответа на чужеродный антиген по сравнению с циклоспорином А.

Рацемическая смесь - смесь эквимолярных количеств двух энантиомеров.

Ревертант - мутант, появляющийся в результате реверсии (возвращения) к исходному фенотипу с восстановлением в ДНК исходной последовательности нуклеотидов.

Резистентность множественная лекарственная (полирезистентность) - применительно к антибиотикорезистентности означает наличие в плазмиде или в хромосоме ряда генов, обусловливающих резистентность к ряду различных антибиотиков.

Рекомбинантная ДНК - молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих фрагментов ДНК.

Репликация - процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК.

Репрессор - белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.

Рестриктаза - фермент, расщепляющий углеводно-фосфатную цепь нуклеотидов в ДНК в зависимости от своей специфичности.

Существует много десятков рестриктаз.

Ретровирусы - группа РНК-содержащих вирусов, имеющих обратную транскриптазу. Синтезированная на РНК-матрице двух-

цепочечная ДНК может встраиваться в хромосому инфицированной этим вирусом клетки.

Ретроингибирование - ингибирование одного из начальных ферментов конечным продуктом метаболического пути.

Рибозим - молекула РНК, обладающая ферментативной активностью.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) - нуклеиновая кислота, состоящая из рибонуклеотидов, у которых сахаром является рибоза, а одним из пиримидинов - урацил (вместо тимина в ДНК).

Рибосома - клеточная органелла, рибонуклеопротеидная частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субчастиц: большой и малой.

РНК-полимераза - фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК; соответствующие РНК-полимеразы называют ДНКили РНК-зависимыми.

С

Сайт-направленный (сайт-специфический) мутагенез - техника изменения гена с желаемой точечной мутацией, основана на замене одного кодона в полинуклеотидной цепи на другой.

Секвенирование - определение последовательности нуклеотидных пар в ДНК. Ключевая операция для характеристики геномов различных организмов.

Секреция - выведение вещества из клетки во внешнюю среду.

Серотип - антигенная характеристика клетки (бактерии, клетки крови и т.д.), установленная на основании ее взаимодействия с антителами.

Сигма-фактор (σ-фактор) - бактериальный белок (субъединица РНК-полимеразы), являющийся аллостерическим эффектором, который обеспечивает узнавание РНК-полимеразой ее участка связывания в молекуле ДНК и инициацию транскрипции. После инициации транскрипции сигма-фактор отделяется от РНК-полимеразы.

Сигнальный пептид - N-концевой участок белковой молекулы длиной 15-30 аминокислот, обеспечивающий секрецию белка (перенос через мембрану). После секреции этот участок отщепляется от белковой молекулы.

Сидерофор - низкомолекулярное соединение, связывающее железо. Сидерофоры являются переносчиками железа в микробную клетку,

т.е. входят в систему транспорта железа, а иногда даже транспорта против градиента концентрации.

Гены, кодирующие такие системы у патогенов, являются существенными для жизнедеятельности патогена при его размножении в макроорганизме, в тканях которого концентрация железа, как правило, невысока.

Симбиоз - сосуществование разных организмов, при котором каждый из них выполняет свои функции. В некоторых случаях взаимовыгодно.

Синдром - совокупность ряда симптомов (признаков), характерных для данного заболевания.

Система комплемента - серия последовательных процессов активации комплемента (сложного белкового комплекса сыворотки крови) и ферментативных реакций, запускаемых в ответ на образование комплекса антиген-антитело.

Скорость роста - показатель интенсивности роста культуры, равный отношению прироста биомассы в экспоненциальной фазе к соответствующему интервалу времени.

Скрининг - отбор и первичная оценка на биологическую активность природных веществ. Термин «скрининг» иногда относят также к поиску продуцентов БАВ.

Соматическая клетка - любая неполовая клетка многоклеточного организма.

Сплайсинг - удаление (вырезание) после транскрипции из мРНК интронов (участков, не несущих информации) и связывание оставшихся экзонов (восстановление непрерывности цепи мРНК) посредством ковалентной связи.

Альтернативный сплайсинг - вырезание из мРНК после транскрипции различных частей ее молекулы. Таким образом, один ген может кодировать образование не одного, а нескольких белков, что в свою очередь отменяет парадигму «один ген - один белок».

СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита человека - антропонозная инфекционная болезнь, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), поражающего иммунную систему. Вирус, проникнув в кровь, разносится кровью и лимфой по всем органам и тканям, поражая клетки иммунной системы. Это приводит к нарушению защитной функции иммунной системы, угнетению реакций иммунитета на антигены, синтеза антител к ВИЧ, фагоцитоза, снижению продукции интерферона, интерлейкинов, комплемента.

• ВИЧ-инфекция отличается тотальным поражением Т-, В- и А-клеток иммунной системы.

• Для антигенов ВИЧ характерен высокий уровень изменчивости.

• Специфическая профилактика отсутствует.

• Способы хранения культур микроорганизмов - способы длительного хранения основаны на свойствах микроорганизмов ограничивать или даже прекращать клеточный обмен веществ при изменении внешних условий.

• Хранение в холодильнике. Культуру на агаризованной среде в пробирках помещают в холодильник и хранят при температуре 0-4 °С в течение 1-2 мес.

• Хранение под слоем минерального масла. Культуру, после того как она достигнет полной физиологической зрелости, на поверхности агар-агара заливают слоем стерильного вазелинового масла толщиной не более 1 см и хранят в течение нескольких месяцев.

Хранение в сыпучих материалах. Суспензию микроорганизмов или спор наносят на стерильный материал (зерно, почву, песок, глину), высушивают при комнатной температуре и хранят в стеклянной посуде, закрытой ватной пробкой в течение нескольких месяцев.

• Сублимационное высушивание (см. «Лиофильное высушивание»). Культуры могут сохраняться 5-6 лет без потери физиологических особенностей.

• Хранение при температуре ниже -200 °С. При таком способе культура сохраняется несколько месяцев (во время хранения следует избегать многократных замораживаний и оттаиваний). Культуры некоторых микроорганизмов хранят в 10% водном растворе глицерина в запаянных ампулах в контейнерах с жидким азотом при температуре -1960 °С в течение 5 лет и более.

Стационарное состояние - состояние непрерывного процесса ферментации, при котором число клеток, удаляемых из ферментера, и клеток, поступающих в него, одинаково.

Стенка (клеточная стенка) бактерий - жесткая опорная структура оболочки, определяющая форму клеток и расположенная над цитоплазматической мембраной.

• Клеточная стенка противодействует лизису клеток вследствие различия осмотических давлений цитоплазмы клетки и внешней среды. Основной полимер клеточной стенки - пептидогликан.

• Биосинтез предшественников пептидогликана происходит в цитоплазме, а сборка его из субъединиц в полимер - над цитоплазматической мембраной.

• Ферменты, катализирующие реакции сборки пептидогликана, локализованы в цитоплазматической мембране.

• Стерилизация технологического (пропускаемого через питательную среду в ферментере) воздуха - освобождение воздуха от пыли, частиц, влаги и микроорганизмов производится путем фильтрации. Система получения стерильного воздуха содержит фильтр предварительной (грубой) очистки, компрессор, холодильник, головной фильтр (общий на ферментационный цех), фильтр индивидуальный для каждого отдельного ферментационного аппарата.

Большинство биообъектов (микроорганизмов-продуцентов целевых биотехнологических продуктов) - аэробы.

• Подаваемый в ферментер воздух должен быть стерилен. Количество расходуемого воздуха огромно, например, через ферментер объемом 50 $м^3$ пропускается 3000 $м^3$ воздуха в час, а ферментации длятся несколько суток.

• Фильтрующие материалы на разных стадиях очистки воздуха различны. На стадии тонкой очистки (индивидуальные фильтры) применяют тонковолокнистые материалы в виде листов картона и бумаги, керамические, металлокерамические, а также мембранные фильтры.

Стерины (греч. *stereos* - твердый) - кристаллические вторичные спирты группы C_{27}-C_{29} с температурой плавления в пределах 100-200 °С, выделяемые из неомыляемых остатков различных липидов животного или растительного происхождения.

Субъединица - молекула белка, обладающая третичной структурой.

Сульбактам - β-лактамная структура, обладающая слабым антибиотическим действием, но высокой ингибиторной активностью в отношении β-лактамаз. Используют в комбинированном препарате уназин* для защиты ампициллина от β-лактамаз.

Суспензионная культура - тип культуры, в которой клетки размножаются в толще жидкой питательной среды в виде суспензии.

Т

Т-ДНК - фрагмент Ti-плазмиды, который встраивается в ядерную ДНК клетки-хозяина и стабильно наследуется ею. Вызывает образование опухоли (корончатого галла) у растений.

Телитромицин - новый макролидный антибиотик, производное эритромицина. В отличие от последнего, при C_3-атоме у телитромицина вместо L-кладинозы находится кетогруппа, а при C_{11}-C_{12} имеется карбаматная группа, связанная с имидазолом и пиридиновым ядром.

Телитромицин обладает высокой активностью против эритромицинорезистентных штаммов кокковых бактерий.

Терминация - остановка синтеза макромолекулы.

Тимин - пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК.

Т-лимфоциты (Т-клетки) - лимфоциты, дифференцировка которых происходит главным образом в тимусе. Выполняют ключевые функции в развитии и регуляции иммунного ответа.

Трансгенный организм - организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генной инженерии.

Трансдукция - перенос генетического материала хромосомного или внехромосомного происхождения из клетки в клетку, осуществляемый фагом.

Транскрипция - процесс синтеза РНК, катализированный РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

Трансляция - синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы мРНК.

Транспозоны конъюгативные - фрагменты ДНК, несущие генетическую информацию, не связанную с самим процессом перемещения (например, гены резистентности к антимикробным агентам) и способные к переходу из клетки в клетку путем конъюгации в отличие от обычных транспозонов, которые мигрируют из репликона в репликон только внутри клетки.

Трансфекция - искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

Третичная структура - трехмерная структура белка.

Триплет - кодон аминокислоты, включающий три нуклеотида в генетическом коде.

У

Убихиноны (коферменты Q_{10}) - синтезируются в организме человека, при нарушении биосинтеза возникают анемии. Большинство микроорганизмов синтезирует убихиноны с числом изопренильных

звеньев, равным 6-8, а для медицинских целей представляет интерес кофермент Q_{10}. Продуцентами этого убихинона являются представители родов *Gluconobacter* и *Acetobacter*. Использование этих микроорганизмов особенно перспективно, так как их же применяют в производстве аскорбиновой кислоты при биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу. В последнее время также было установлено, что убихиноны могут быть использованы в геронтологической практике.

Улавливание экзона - метод идентификации клонирования экзонов из геномных клонов. Фрагменты геномной ДНК встраивают в полилинкер вектора, расположенный внутри интрона, фланкированного двумя экзонами. Полученным искусственным геномом (экзон 1-интрон-экзон 2) трансфицируют клетки *E. coli,* в которых происходит его транскрипция и сплайсинг мРНК. Если в интроне присутствует экзон, то зрелая мРНК будет иметь большую длину, чем ожидалось. мРНК можно подвергнуть обратной транскрипции, провести ПЦР и выделить экзон.

Урацил - пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований в составе РНК.

Устойчивые клеточные линии - культуры клеток, способные к неограниченному росту *in vitro*. Получаются из перевиваемых клеточных культур, часть клеток которых приобретает селективные преимущества и обладает повышенной скоростью роста.

Ф

Фагоциты - клетки разных типов (разная морфология, продолжительность жизни и т.д.), имеющие общие сходные свойства, такие, как направленное передвижение, способность к фагоцитозу (поглощению и уничтожению микробных клеток), продукция активных форм кислорода, многих бактерицидных белков и пептидов, медиаторов иммунного ответа. К фагоцитам относят полиморфно-ядерные нейтрофилы с короткой продолжительностью жизни и мононуклеарные клетки с длительной продолжительностью жизни, дифференцирующиеся в макрофаги.

Фенотип - совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

Ферментация - термин для обозначения биосинтеза как технологического процесса.

Ферментация непрерывная - термин, используемый для характеристики одного из способов ферментации в производственных усло-

виях, когда из ферментационного аппарата непрерывно отбирается часть культуральной жидкости и одновременно такое же по объему количество стерильной питательной среды вносят в ферментер.

Способ непрерывной проточной ферментации считается технологически обоснованным, если задачей ставят накопление биомассы микроорганизма.

Ферментация многоциклическая - термин для обозначения процесса, когда из ферментера сливается и направляется в цех химической очистки 90% культуральной жидкости, а затем такой же объем питательной среды вносят в ферментер.

В этом случае не требуется постоянного приготовления посевного материала и нового засева ферментера.

Ферментация в периодическом режиме - культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени. Свежую питательную среду засевают посевным материалом и проводят культивирование в непрерывном режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продуктов биосинтеза, пока процесс не завершится.

Ферментация отъемно-доливная - термин для характеристики промежуточного процесса между периодической и непрерывной ферментацией.

Ферментация регулируемая (полупериодическая) - термин для обозначения ферментационного процесса, протекающего, как правило, несколько суток, систематически контролируемого по показателям датчиков и корректируемого в случае отклонения от регламентных показателей, таких, как концентрация в среде источников углерода, азота, фосфора, значений pH и т.д.

• Соответствующие добавки вносят в ферментер при соблюдении стерильности.

• Предшественники целевого продукта вносят в тот период ферментации, когда происходит его максимальный синтез.

Фертильность - способность организмов приносить жизнеспособное потомство.

Фиксация азота - превращение атмосферного азота в аммиак, которое катализируется ферментом нитрогеназой, обнаруженной только у прокариот.

Флеминг Александр (1881-1955) - основоположник современной науки об антибиотиках. Им был открыт штамм продуцента пенициллина. Лауреат Нобелевской премии.

Флори Говард Уолтер (1898-1968) - врач-клиницист, возглавлявший в годы Второй мировой войны работы по клиническим испытаниям и внедрению в практику пенициллина, лауреат Нобелевской премии. Ему также принадлежат большие заслуги в области изучения цефалоспоринов.

Фосфодиэфирная связь - связь между фосфатными группами при 3'- и 5'-углеродных атомах соседних нуклеотидов одной полинуклеотидной цепи.

Фрагмент F(ab) - антиген-связывающий фрагмент, фрагмент молекулы Ig, взаимодействующий с антигеном.

Футпринтинг - метод идентификации участков ДНК, специфически связывающихся с белками. В его основе лежит защита ДНК в местах контакта с белком от эндонуклеазного расщепления.

Х

Химерные антитела - гибридные иммуноглобулины, состоящие из части антитела человека и части антитела другого организма.

Хламидия - грамотрицательная патогенная бактерия. Известно несколько видов хламидий: *Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis* и др. Является внутриклеточным паразитом и размножается только внутри животных клеток. Система экскреции белков у хламидий обеспечивает ее инвазию в клетку хозяина и разрушение защитных механизмов последней. Клеточная стенка хламидий содержит аналог пептидогликана, синтез которого также чувствителен к β-лактамным антибиотикам.

Хромогенный субстрат - вещество, приобретающее определенную окраску после расщепления специфическим ферментом.

Хромосома - структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК; носитель генетической информации; способна к воспроизведению с сохранением стуктурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений. У эукариот находится в ядре клетки, у прокариот - непосредственно в цитоплазме.

Ц

Циклический АМФ (cAMP) - циклический аденозинмонофосфат - соединение, необходимое для протекания метаболических процессов, требующих энергетических затрат.

Циклоспорин А - циклопептид, состоящий из одиннадцати аминокислотных остатков, обладает иммуносупрессорными свойствами.

Продуцентом циклоспорина А является гриб рода *Tolypocladium,* для которого характерен высокий уровень спорообразования.

Циклоспорин А подавляет отторжение трансплантатов и используется при пересадке органов и тканей. После реакции циклоспорина А с цитозольным белком циклофилином образуется комплекс, который инактивирует кальций-нейрин и прерывает на этой стадии сигнальную трансдукцию - каскад ответных реакций на чужеродный антиген.

Цистрон - генетическая единица, эквивалентная гену и кодирующая отдельный белок.

Цитозин - пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований в составе РНК и ДНК.

Цитокины - белки, секретируемые лейкоцитами и другими клетками иммунной системы и осуществляющие межклеточное взаимодействие при иммунном ответе.

Цитокинины - растительные гормоны, индуцирующие деление клеток.

Ч

Частота рекомбинаций (рекомбинантный индекс) - число рекомбинантов (или рекомбинантных хромосом) по отношению к общему числу потомков (или хромосом).

Чейн (Хайн) Эрнест (1906-1979) - британский химик, впервые выделивший пенициллин, лауреат Нобелевской премии. Работал сначала в Оксфордском университете, а затем в течение ряда лет возглавлял институт санитарии и гигиены в Риме.

Челночный вектор - плазмидная ДНК, способная реплицироваться в клетках сразу двух разных видов (например, в клетках *E. coli* и дрожжей).

Четвертичная структура - организация в пространстве полипептидных субъединиц при формировании многосубъединичных белков.

Ш

Штамм - культура генетически однородных микроорганизмов.

Э

Эйкозаноиды - класс соединений, включающий простагландины, тромбоксаны, лейкотриены. Все соединения этого класса происходят от арахидоновой кислоты.

Экзоны - несущие информацию участки генов эукариот, которые сохраняются в транскрипте после удаления (вырезания) из него интронов. Последовательность экзонов составляет зрелую мРНК.

Наличие экзонов и интронов в генах эукариот составляет проблему для генных инженеров, если их задачей является внедрение гена человека в бактериальную клетку. В этом случае ген не должен содержать интронных участков. С помощью фермента - обратной транскриптазы - зрелая мРНК гена «переписывается» на ДНК и такой искусственный, состоящий только из экзонов, ген включают сначала в вектор, а затем в бактериальную клетку.

Экспрессия - означает «выражение себя», реализацию своего предназначения.

Экспрессия гена - его транскрипция и трансляция.

Электропорация - образование пор в клеточных мембранах под действием электрического тока. Через эти поры в клетки проникает чужеродная ДНК.

Электрофорез - классический биохимический метод разделения несущих заряд молекул белка, нуклеиновых кислот и других веществ, основанный на различной для разных молекул скорости их движения в электрическом поле.

Метод имеет десятки разновидностей (вариантов). В настоящее время метод двумерного электрофореза на бумаге является основным используемым в протеомике методом, который позволяет вести мониторинг белков во время любого цикла развития клетки, при реагировании клетки на внешнее воздействие и т.д.

Элонгация - последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

Эндотоксины - токсические субстанции, входящие в структуру бактерий (обычно в клеточную стенку) и высвобождающиеся из них после лизиса. В основном данный термин употребляют применительно к липополисахаридам клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Эндоцитоз - процесс поглощения клеткой экстраклеточного материала.

Эпитоп (антигенная детерминанта) - фрагмент молекулы (молекул) антигена (локализующийся внутри или на поверхности молекулы), индуцирующий иммунный ответ и определяющий его специфичность. Антигенная детерминанта избирательно реагирует с антигенраспознающими рецепторами и/или с антителом.

Эргостерин - исходный продукт производства жирорастворимого витамина D_2. Источником эргостерина служат фитопланктон, бурые и зеленые водоросли, но особенно богаты эргостерином дрожжи и плесневые грибы. Бактерии, как правило, синтезируют ничтожные количества стеринов.

В промышленности эргостерин получают, используя дрожжи *Sacch. cerevisiae, Sacch. car1sbergensis,* а также мицелиальные грибы.

Эрлифтный биореактор - цилиндрический биореактор, в котором перемешивание осуществляется потоком воздуха, подаваемого снизу.

Эрлих Пауль (1854-1915) - немецкий исследователь, основатель научной химиотерапии. В 1908 г. ему была присуждена Нобелевская премия за концепцию гуморального иммунитета (одновременно за концепцию клеточного врожденного иммунитета Нобелевская премия была вручена И.И. Мечникову). В 1909 г. он совместно с А. Бергеймом запатентовал полученный в результате систематического скрининга веществ из группы арсенобензолов «препарат 606» или сальварсан^{p}, применение которого в клинике привело к перевороту в лечении сифилиса и некоторых других паразитарных заболеваний. Эрлихом впервые были сформулированы постулаты химиотерапии, дано понятие химиотерапевтического индекса, указано на возможности развития резистентности к химиотерапевтическому агенту и т.д.

Эффектор аллостерический - обозначение регуляторных молекул, которые ингибируют или активируют аллостерические ферменты.

Эукариот - организм с оформленным ядром и более сложной организацией клетки, чем у прокариот. Низшие эукариоты: грибы, дрожжи, простейшие. Высшие - растения, животные.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. *Бейли Дж., Оллис Д.* Основы биохимической инженерии: пер. с англ. - М.: Мир, 1989.

2. Биотехнология лекарственных средств: учебное пособие / под ред. В.А. Быкова, М.В. Данилина. - М.: Медбиоэкономика, 1991. -

303 с.

3. Биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джойса. - М.: Мир, 1998. - 573 с.

4. *Елинов Н.П.* Основы биотехнологии. - СПб.: Наука, 1995. -

600 с.

5. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках: учебник для студентов биологических специальностей университетов. - М.: Высшая школа, 2005.

6. *Ланчини Д., Паренти Ф.* Антибиотики: пер. с англ. - М.: Мир,

1985.

7. *Медуницин Н.В.* Вакцинология. - М.: Триада-Х, 1999.

8. *Мониатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 2000.

9. *Прищеп Т.П., Чучалин В.С.* и др. Основы фармацевтической биотехнологии. - Томск: НТЛ, 2006.

10. *Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н.* Биотехнология. - М.: Академия,

2006.

11. *Шлегель Г.* Общая микробиология: пер. с нем. - М.: Мир, 1987.

Дополнительная

1. *Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашев А.В.* и др. Иммобилизованные ферменты // Биотехнология, кн. 7, учебное пособие для вузов. - М.: Высшая школа, 1987. - 159 с.

2. *Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К.* и др. Инженерная энзимология // Биотехнология, кн. 8, учебное пособие для вузов. - М.: Высшая школа, 1987. - 143 с.

3. *Бибикова М.В., Иваницкая Л.П.* Современные проблемы поиска природных антибиотиков // Лекарственные средства, экономика, технология и перспективы получения. - М.: Минмедпром, 1990. -

Вып. 7. - С. 127.

4. *Быков В.А., Крылов А.И., Манаков М.Н.* и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов //

Биотехнология, кн. 6, учебное пособие для вузов. - М.: Высшая школа, 1987. - 143 с.

5. *Быков В.А., Манаков М.Н., Панфилов В.И.* и др. Производство белковых веществ // Биотехнология, кн. 5, учебное пособие для вузов. - М.: Высшая школа, 1987. - 142 с.

6. *Варфоломеев С.Д.* Химическая энзимология. - М.: Академия,

2005. - 480 с.

7. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. - М.: Мир, 2002. - 589 с.

8. Государственная фармакопея СССР: издание XI, вып. 2. - М.:

Медицина, 1990. - 1398 с.

9. *Дебабов В.Г., Лившиц В.А.* Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов // Биотехнология, кн. 2, учебное пособие для вузов. - М.: Высшая школа, 1988. - 208 с.

10. *Дьяконов Л.П., Ситьков В.И.* Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). - М.: Компания Спутник, 2000.

11. Иммобилизованные клетки и ферменты: пер. с англ. / под ред.

Дж. Вудворта. - М.: Мир, 1998. - 608 с.

12. *Кантере В.М.* Теоретические основы технологии микробиологических производств. - М.: Агропромиздат, 1990.

13. *Куваева И.Б., Ладодо К.С.* Микроэкологические и иммунные нарушения у детей. - М.: Медицина, 1991.

14. *Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия: 4-е изд. - М.: Медицина, 1982.

15. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. - М.: Медицина, 2004.

16. Метаболизм микроорганизмов. Практикум / под ред. Н.С. Егорова. - Московский университет, 1986.

17. Практикум по биоорганической химии // Раздел «Химия нуклеиновых кислот и основы генетической инженерии» / под ред.

Т.В. Овчинниковой, Т.И. Сорокиной. - М.: ИБХ РАН, 2007.

18. *Шилова С.В., Пузакова С.М.* и др. Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. Химикофармацевтическое производство, обзорная информация. - М.: ВНИИСЭНТИ, 1990.