

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- Стр.1 из 72	(2023-24)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

Дисциплина:	Фармацевтическая биотехнология
Код дисциплины:	FB 3308
ОП:	«Фармация»
Объем учебных часов/ кредитов:	120 часов/ 4 кредитов
Курс и семестр изучения:	3 курс 6 семестр
Практические занятия:	30 часов

Шымкент, 2023 год

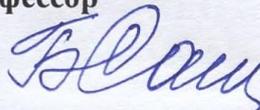
ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.2 из 72	

Методические рекомендации для практических занятий разработаны в соответствии с syllabusом дисциплины «Фармацевтическая биотехнология» и обсуждены на заседании кафедры технологии лекарств

Протокол №14 от 31.05.2023 г.

**Заведующая кафедрой технологии лекарств,
 доктор фармацевтических наук, профессор**

Сагиндыкова Б.А.



ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.3 из 72	

Занятие № 1

Тема 1: Микроорганизмы – продуценты ценных веществ с заданными свойствами.

Цель: ознакомить студентов с основами биотехнологии, основами генной инженерии и основами культуры ткани.

Задачи обучения

студент должен знать:

- определение биотехнологии как науки, ее цели и задачи, основное содержание;
- преимущества и недостатки биотехнологического производства целевых продуктов с заданными свойствами;
- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации;

студент должен уметь:

- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы, грибы, простейшие и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.
4. Технология готовых лекарственных форм: таблеток, инъекционных растворов в ампулах, мазей и др.

по теме занятия:

1. Биотехнология как наука, ее определение. Краткая история становления биотехнологии как науки.
2. Основные цели и задачи биотехнологии, ее основное содержание.
3. Преимущества и недостатки биотехнологического производства целевых продуктов с заданными свойствами.
4. Объекты биотехнологии, их особенности.
5. Общая классификация объектов биотехнологии: бактерии, грибы, плазмиды и др.
6. Общая характеристика плазмид бактерий.
7. Вред от микроорганизмов и пути его преодоления.
8. Достижения биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства.
9. Достижения биотехнологии в медицине и фармации.
10. Основные направления развития биотехнологии как науки и отрасли народного хозяйства.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Биотехнология как самостоятельная наука сформировалась в 80-е годы XX столетия благодаря ряду важнейших открытий в различных областях науки, в том числе в молекулярной биологии, генной инженерии, биохимии, биоэлектрохимии и др. Впервые термин «биотехнология» был официально зарегистрирован в 1984 году после основания Европейской Федерации Биотехнологии (ЕФБ).

Первыми продуктами биотехнологии являются продукты, полученные из зерна и других злаков: хлеб, пшеничный и ячменный солод, пиво; из молока: кисломолочные продукты, сыры и др. Позже, не зная об участии микроорганизмов в сложных процессах ферментации, люди научились извлекать цветные металлы из руд, производить натуральный шелк, обрабатывать кожу и дерево, получать вино, уксус и др.

В настоящее время в биотехнологии используются термины Древней Греции и Древнего Рима, которыми обозначают «рабочие» белки: «энзим» - (греч.) – поднимать; «фермент» - (лат.) – брожение, кипение.

Основоположником биотехнологии можно считать Луи Пастера, который в 1872-76 г.г. положил начало микробиологии как самостоятельной науки. Он теоретически обосновал процесс брожения, указав на ведущую в нем роль микроорганизмов, и показал, что другие микроорганизмы участвуют в преобразовании других продуктов.

По определению ЕФБ, «Биотехнология – это интегрированное использование биохимии, микробиологии и инженерных наук с целью промышленного применения способности микроорганизмов, культуры тканей и клеток, а также их частей создавать продукты с заданными свойствами».

Объектами биотехнологии, в том числе генетической инженерии, являются: а) микроорганизмы: грибы, бактерии, вирусы, простейшие и др.; б) клетки растений, реже животных; в) биологически активные вещества специального назначения – ферменты; г) плазмиды.

Мир микроорганизмов чрезвычайно разнообразен. По мере их открытия и изучения они были распределены на следующие группы:

1. Бактерии – Schizomycetes – грибы-дрожжанки (от лат. Schizo – расцепляю, mycetes – грибы);
2. Лучистые грибы – Actinomycetes (от лат. Actino - луч);
3. Нитчатые грибы – Trichomycetes (от греч. Trichos – волос) ;
4. Дрожжевые грибы – Blastomycetes (от греч. blastos - почка, размножение почкованием);
5. Сине-зеленые водоросли – Cyanophyta, они же цианобактерии – Cyanobacteria;
6. Спирохеты – Spirochaena (от греч. Spira - спираль и chaita - волос);
7. Простейшие – Protozoa;
8. Риккетсии – Rickettsia;
9. Микоплазмы – Mycoplasma;
10. Вирусы;
11. Плазмиды.

Микроорганизмы, применяемые в промышленной микробиологии, то есть биотехнологии можно условно классифицировать следующим образом:

1. Некоторые водоросли – Algae;
2. Простейшие – Protozoa;
3. Грибы – Mucor:
 - а) Actinomycetes; б) Streptomycetes; в) Ascomycetes; г) Oomycetes.

Грибы Mucor делятся на:

- | | | |
|--|---|-----------------------------------|
| а) плесневые – Penicillium;
патогенным) | } | относятся к сапрофитным (условно- |
| б) дрожжевые – Aspergillus; | } | t° = 23 – 26°C, аэробы |
| в) дрожжеподобные – Candida; | } | патогенные (вызывают кандидозы) |
| г) дрожжи – Saccharomycetes. | | |

Грибы выращивают (для сохранения культуры) на питательных средах Сабуро, Чапека- Докса, жидком сусле или сусло-агаре при pH ниже 7,0. Грибы способны размножаться при pH от 3,0 до 10,0. Оптимальными являются параметры: pH 6,0-6,5, t = 25-33°C, для дрожжевых и дрожжеподобных грибов – 36-37°C. Спорообразованию способствуют снижение влажности питательной среды и уменьшение в ней содержания белков и углеводов. Витамины, некоторые аминокислоты и микроэлементы для различных грибов являются важными факторами роста.

Поскольку большинство грибов относятся к аэробам, они вырастают в виде пленок на поверхности жидких сред, а на твердых средах образуют вначале бесцветные, а затем, как правило, пигментированные колонии. Размеры колоний зависят от вида гриба, скорости его роста и размножения, состава питательной среды.

Грибы имеют ряд признаков, присущих клеткам животных организмов. Для них характерны гетеротрофный тип питания и потребность в витаминах. Они образуют мочевины и синтезируют гликоген (а не крахмал) в качестве резервного гомогликана, содержат хитин.

Грибы – бесхлорофилльные, гетеротрофные аэробные или факультативно-анаэробные микроорганизмы. Многие из них растут в течение 1–5 суток (иногда и более) на минимальных по составу ингредиентов питательных средах, включающих приемлемый органический источник углерода (н-р, олигосахара), неорганический источник азота в форме нитратов или аммонийных солей, при исходном значении рН 6,0-6,5.

Грибы чаще размножаются с помощью спор, а также вегетативно, образуют мицелий.

Бактерии. Энтеробактерии. Это семейство включает большую группу условно-патогенных патогенных палочек, средой обитания большинства из которых является кишечник человека и животных. Энтеробактерии: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* - хорошо растут на простых питательных средах, продуцируют сахаролитические, протеолитические и другие ферменты, определение которых имеет таксономическое значение.

Род *Escherichia* назван именем Т. Эшериха, который в 1885 г. впервые выделил и подробно описал бактерии, названные кишечной палочкой – *Esch. coli*.

Esch. coli, размножаясь при $t^{\circ} = 37^{\circ} \text{C}$ на плотных средах, образуют S- и R- колонии. В жидких средах дают помутнение, затем осадок. Продуцируют ферменты, расщепляющие углеводы, белки и другие соединения.

Азотфиксирующие бактерии – *Clostridium pasteurianum* (анаэробы) – были открыты в 189 году С.Н. Виноградским. К ним относятся некоторые виды *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, цианобактерий.

Антибиотикопроизводящие грибы:

а) пенициллины производят плесневые грибы рода *Penicillium* (открыты в 1940 г.);

б) стрептомицин производят некоторые виды *Actinomyces griseus* (препарат был предложен в 1944 г. С. Ваксманом);

в) цефалоспорины производят некоторые виды грибов рода *Cephalosporium* и другие.

Антибиотики, вырабатываемые одними микроорганизмами, подавляют рост и размножение других видов микроорганизмов (бактериостатическое действие). Механизмы микробного антагонизма различны; они могут быть связаны с конкуренцией за кислород и питательные вещества, с изменением рН среды в сторону, неблагоприятную для конкурента и т.п.

Наиболее важным объектом биотехнологии, в частности молекулярной биологии и генетической (генной) инженерии являются **плазмиды** бактерий как наипростейшие. Имея ряд сходств с вирусами, плазмиды тем не менее существенно от них отличаются.

Главные отличия плазмид бактерий от вирусов:

1. Геном плазмид представлен только двунитевой ДНК (которую в молекулярной биологии научились расщеплять). У вирусов имеется более 10 вариантов РНК- и ДНК-геномов.
2. Плазмиды, в отличие от вирусов и других микроорганизмов, вообще не имеют никакой оболочки. Они представляют собой «голые» геномы. Это главная биологическая особенность плазмид.
3. В связи с отсутствием белковой оболочки размножение плазмид происходит только путем саморепликации их ДНК и не требуют синтеза структурных белков и процессов самосборки (вирусы имеют оболочки).
4. Средой обитания вирусов являются клетки бактерий, растений, животных и человека. Среда обитания плазмид – только бактерии.
5. В отличие от вирусов, плазмиды обладают системами генов, которые наделяют их способностью к самопереносу или к мобилизации на перенос из клетки в клетку.
6. Плазмиды и вирусы отличаются друг от друга и по последствиям, к которым приводит инфицирование ими клеток:
 - заражение вирусом часто приводит к подавлению функционирования клеточного генома. Вирулентный (токсичный) вирус размножается в клетке и вызывает ее гибель или нарушает нормальное функционирование;
 - плазмиды, проникая в бактериальную клетку, не размножаются в ней бесконтрольно и не подавляют функции бактериальной хромосомы, а сосуществуют с ней и сами контролируют образование числа возможных своих копий на хромосому клетки. То есть в плаزمидах

осуществляется контроль равномерного распределения (по одной) дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки не рандомически (случайно), а с помощью генетического механизма;

- в отличие от вирусов, плазмиды не только не вызывают гибели клеток, которые являются для них естественной средой обитания, а, наоборот, очень часто наделяют их важнейшими дополнительными (селективными) свойствами, то есть плазмиды своим присутствием обеспечивают размножение бактерий в неблагоприятных для них условиях (например, в присутствии лекарственных препаратов), таким образом обеспечивая собственное существование.

Благодаря этим отличиям от вирусов, плазмиды нашли применение в генной инженерии для генетической перестройки, то есть используются в качестве векторов для клонирования различных генов в бактерии.

Методы биотехнологии:

1. Поверхностное культивирование на твердых и полутвердых питательных средах с целью: а) получения посевного материала; б) для сохранения культуры в течение длительного срока; в) наращивания каллусной биомассы при культивировании ткани или клеток растений;
2. Крупномасштабное глубинное культивирование биологических объектов в специальном режиме для получения целевых продуктов (ферментация).

В медицине, фармацевтической технологии, ветеринарии и косметологии уже достаточно широко применяются продукты биотехнологического производства: ферменты микробиологического синтеза, моноклональные антитела, антибиотики, стероидные препараты, полисахариды, рекомбинантные ДНК, биополимеры, липиды, полисахариды, человеческий интерферон, различные белковые препараты.

Преимущества биотехнологического способа производства получения продуктов с заданными свойствами:

- специфичность получаемых продуктов;
- легкость контроля технологического процесса;
- работа при низких температурах и без участия агрессивных химических сред, токсических растворителей и др.;
- простота выделения целевых продуктов;
- доступность и дешевизна исходного сырья;
- его высокая репродуктивная способность, что позволяет за короткое время быстро наращивать необходимое количество биомассы;
- совместимость с окружающей средой и др.

Основные направления развития Биотехнологии:

1. Поиск новых и совершенствование известных процессов биосинтеза и биодеградации (переработка отходов).
2. Поиск экологически чистых методов получения углеродсодержащего сырья для химической промышленности.
3. Поиск новых методов биотехнологической переработки и очистки продуктов.
4. Совершенствование производства продуктов бытовой химии (клеи, красители, душистые вещества, волокна, пластмассы, полимеры и др.).
5. Создание новых источников энергии.
6. Совершенствование производства экологически чистых и защищенных от микроорганизмов пищевых продуктов и напитков.
7. Внедрение биотехнологических способов в производство фармацевтических препаратов, медикаментов и предметов для медицинского и санитарно-гигиенического применения.
8. Добыча и переработка минерального сырья, внедрение биотехнологических способов получения (выделения) чистых металлов из руд.
9. Внедрение биотехнологических способов по контролю за окружающей средой.

Однако при использовании микроорганизмов во благо необходимо, прежде всего, знать вред от них и пути его предотвращения. Вред от микроорганизмов называется биоповреждением и представляет собой любое нежелательное изменение свойств материалов, вызванное жизнедеятельностью микроорганизмов.

Биоповреждения и пути их предотвращения:

Биоповреждениям подвергаются, прежде всего, следующие материалы:

1. Пищевые продукты. Для их защиты от микроорганизмов используется замораживание, засаливание, засахаривание, кипячение, консервирование (введение специальных химических добавок-консервантов) и др.
2. Целлюлоза и изделия из нее (бумага, дерево, ткани). Например, хлопчатобумажная ткань, находясь в земле при +25° С, полностью теряет свою прочность, поэтому натуральные и полусинтетические ткани, деревянные изделия, некоторые сорта бумаги пропитывают специальными химическими составами.
3. Поверхностные покрытия (пластик, пластмассы), предназначенные для защиты изделий от окислительной коррозии, могут сами подвергаться биокоррозии под действием микроорганизмов. Поэтому в их состав также вводят химические добавки.
4. Металлы (различные трубопроводы, особенно, находящиеся в земле) также подвергаются биокоррозии под действием железобактериальных (и других) микроорганизмов. Кроме того, микроорганизмы могут накапливаться в трубопроводах, сужая их просвет.
5. Различное топливо и смазочные материалы тоже нуждаются во введении различных химических добавок, т.к. они могут подвергаться действию литотрофных микроорганизмов.
6. Биоповреждениям подвергаются также драгоценные металлы (золото), драгоценные и полу драгоценные камни (бирюза, янтарь, кораллы), поэтому они также нуждаются в обработке химическими составами.
7. Резины и пластмассы достаточно устойчивы к воздействию микроорганизмов, т.к. возможность биоповреждений была учтена и предотвращена уже при их создании.

Защита материалов различной природы от биоповреждений является самостоятельной задачей биотехнологии.

Большинство микробиологических (биотехнологических) производств до недавнего времени основывалось исключительно на применении клеток соответствующих микроорганизмов; многие такие производства существуют и в настоящее время. Это условно называемый

«клеточный» уровень биотехнологических процессов. В качестве примера можно назвать разные виды брожения: маслянокислое, молочнокислое, спиртовое и др., а также окислительные процессы (получение уксусной, лимонной, яблочной и других кислот), производство большинства антибиотиков, дрожжей и т.д.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Подобрать наиболее рациональные способы защиты различных лекарственных форм от биоповреждений и теоретически их обосновать:

- А) жидких лекарственных форм для внутреннего применения;
- Б) жидких лекарственных форм для парентерального применения;
- В) жидких лекарственных форм для энтерального применения (глазные капли, примочки, капли для носа, полоскания и др.);
- Г) мягких лекарственных форм (мази, линименты, суппозитории и др.);
- Д) твердые лекарственные формы.

Во время выполнения заданий студенты должны теоретически обосновать и правильно подобрать условия стерилизации, природу и количество консервантов, виды упаковки для различных лекарственных форм (их конструкцию и материал) и другие способы защиты лекарства от микробной контаминации.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.8 из 72	

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение биотехнологии как науки. Когда она была выделена в качестве самостоятельной науки и чем обусловлено ее выделение в отдельную отрасль науки и производства?
2. Каковы основные цели и задачи биотехнологии? Каково ее основное содержание?
3. Каковы преимущества и недостатки биотехнологического производства целевых продуктов с заданными свойствами?
4. Что являются объектами биотехнологии? Каковы их особенности?
5. Дайте краткую классификацию объектов биотехнологии.
6. Каковы главные отличия плазмид бактерий от вирусов?
7. Какие методы культивирования применяются в биотехнологии? В каких случаях? Каковы их масштабы и цели?
8. Назовите основные достижения биотехнологии народного хозяйства в энергетике, пищевой промышленности, экологическом мониторинге (контроле окружающей среды), сельском хозяйстве и др.
9. Каковы особенно значимые достижения биотехнологии в области молекулярной биологии?
10. Назовите наиболее значимые достижения биотехнологии в медицине, фармации и ветеринарии.

Занятие № 2

Тема 2: Физиологические подходы направленного биосинтеза целевых продуктов.

Питательные среды и критерии качества исходного сырья.

Цель: Ознакомить студентов теоретическими основами и методами расширения номенклатуры промышленных штаммов-продуцентов.

Задачи обучения

студент должен знать:

- основные понятия и термины биотехнологии: культура микроорганизма, штамм, сверхпродуценты и др.;
- методы биотехнологии;
- основные компоненты питательных сред и критерии качества исходного сырья;
- технологию приготовления посевных (агаризованных твердых и полутвердых) сред;
- технологию приготовления ферментационных (жидких) сред;
- стерилизацию и правила хранения посевных и агаризованных сред;
- правила введения необходимых компонентов в ходе культивирования микроорганизма;

студент должен уметь:

- подбирать основные компоненты питательных сред и оценивать качество исходного сырья;
- проводить технологию приготовления посевных (агаризованных твердых и полутвердых) сред;
- осуществлять технологию приготовления ферментационных (жидких) сред;
- проводить стерилизацию и соблюдать правила хранения посевных и агаризованных сред;
- вводить необходимые компоненты в ходе культивирования микроорганизма.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные термины по микробиологии.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.
4. Технология приготовления питательных сред для микроорганизмов.
5. Методы и способы стерилизации, применяемое оборудование.

по теме занятия:

1. Основные термины и понятия микробиологии и биотехнологии: микроорганизм, культура, штамм и др.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.9 из 72	

2. Методы расширения номенклатуры промышленных штаммов.
3. Индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор.
4. Питательные среды и критерии качества исходного сырья.
5. Требования к питательным средам.
6. Категории питательных сред.
7. Основные пути получения новых штаммов и на их основе – новых продуцентов
8. Сохранение культуры.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Как правило, в промышленной биотехнологии не используют дикие микроорганизмы, а получают штаммы. **Штаммами** (Stammen - нем., происходить) называются чистые культуры микроорганизмов, выращенных в определенных условиях и способных к синтезу определенно-го комплекса веществ (липидов, витаминов, аминокислот и др.) для поддержания их жизнедеятельности, размножению и распространению. Штамм считается низшей таксономической единицей бактерий.

Для получения более совершенных штаммов, синтезирующих заданный (целевой) продукт в больших, чем обычно, количествах, требуется правильный подбор условий их культивирования.

Основным методом расширения номенклатуры промышленных штаммов до сих пор остается индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор. В этом случае популяцию клеток обрабатывают мутагеном (чаще всего специальным химическим веществом или УФ-светом), рассеивают на питательную среду и анализируют популяции, возникшие при размножении отдельных клеток (клональный анализ). Отобрав более продуктивный клон, процедуру повторяют (ступенчатый отбор). Метод чрезвычайно трудоемок. Обычная бактериальная клетка содержит около 5000 генов. Мутагенез неограничен, то есть нельзя предсказать заранее, у какого гена произойдет мутация, поэтому большинство мутаций вредно или летально для клеток, следовательно, нужная мутация (или набор мутаций) возникает редко. Таким образом, основной недостаток метода – непредсказуемость результатов плюс трудоемкость.

При этом (кроме того) ферменты, участвующие в биосинтезе (или в метаболизме) конкретных продуктов, осуществляют их количественный контроль, то есть при повышении внутриклеточной концентрации того или иного вещества его синтез под действием соответствующего фермента снижается или подавляется.

Мутационным путем изменяя фермент так, чтобы он сохранял активность, но терял способность к аллостерической реакции, можно получить суперпродуценты, когда избыток целевого продукта не будет влиять на интенсивность его синтеза. Этот метод широко используется в биотехнологическом производстве аминокислот, витаминов, антибиотиков и др.

Кроме того, при определенных условиях получают синхронные культуры, то есть культуры, в которых все клетки делятся одновременно (синхронно). Однако такая синхронность сохраняется, как правило, в течение 2-3 циклов деления, а затем она нарушается.

Основные пути получения новых штаммов и на их основе – новых продуцентов

Промышленная биотехнология имеет свою главную цель – увеличить количество синтезируемого продукта и улучшить его качество.

Для получения новых штаммов-продуцентов необходимо выделить селективные факторы для получения специфических типов микроорганизмов, которыми можно управлять.

1. Для автотрофных микроорганизмов:

а) для аэробных автотрофных микроорганизмов (живущих при аэрации воздухом):

I вариант: Свет и сульфид отсутствуют.

а) NH_4^+ – источник азота; б) NO_2^- – источник азота.

II вариант: Свет присутствует, а сульфид отсутствует.

Источник азота может быть в свободном (N_2) или в связанном виде.

б) для анаэробных автотрофных микроорганизмов (живущих без воздуха, например, в среде метана и др.):

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.10 из 72	

I вариант: Свет отсутствует. а) сульфид в виде S^0 или $S_2O_3^{-2}$ – окисляют для получения энергии;

II вариант: Свет присутствует. Имеет значение концентрация сульфида (низкая или высокая).

2. Для гетеротрофных микроорганизмов:

а) для аэробных автотрофных микроорганизмов (живущих при аэрации воздухом):

Свет присутствует или отсутствует, pH среды нейтральная или кислая, источник азота – N_2 или азотсодержащие соединения (NO_3^-). Источником серы являются сульфаты (SO_4^{-2}), в качестве источника углерода и CO_2 – вводят глюкозу.

б) для анаэробных автотрофных микроорганизмов (живущих без воздуха, например, в среде метана и др.):

Свет присутствует или отсутствует, pH среды нейтральная или кислая, источник азота – N_2 или азотсодержащие соединения (NO_3^-). Источник серы отсутствует, в качестве источника углерода и CO_2 – вводят глюкозу.

После обработки микроорганизмов мутагенами их культивируют в присутствии их же аналогов, которые тормозят или прекращают их рост. При этом выживают лишь те клетки, которые тем или иным путем преодолели барьеры негативной регуляции.

Как правило, штамм-продуцент должен нести в своем геноме несколько необходимых для сверхсинтеза продукции мутаций.

Стратегия ступенчатого отбора предполагает последовательное введение мутаций в геном микроорганизма. Любой метод генетического обмена может устранить из потомства вредные мутации и собрать в одной клетке нужные.

Аэрация осуществляется подачей через барботер стерильного воздуха или инертного газа (азота). При этом одновременно идет перемешивание ферментационной среды.

При необходимости для стимулирования или ингибирования роста биомассы и усиления синтеза целевых продуктов в питательную среду вводят микроэлементы: Fe^{+2} , Mn^{+2} , Mo^+ и др., а также витамины: H, B1, B2, B6, C, PP и др.

Подробнее о видах мутагенов, механизме их действия, типах мутаций, скрининге мутантов будет рассмотрено в лекции № 5 в разделе «Генетические основы биотехнологии».

Сохранение культуры

Культура (или штамм) микроорганизма называется чистой, если родительские и дочерние клетки практически неразличимы в ней и между ними нельзя установить родственные связи. Как правило, чистые культуры представляют собой коллекционный материал. Для сохранения культуры микроорганизмов их регулярно (один раз в месяц, иногда чаще) пересевают на твердые питательные среды (обычно в чашках Петри или в пробирках, на «косяках», то есть на косом срезе плотной среды) и хранят в холодильнике при температуре $+8+10^0$ C, то есть таким образом, чтобы размножение микроорганизма происходило в основном за счет спорообразования. Чтобы культура клеток не погибла при истощении питательной среды, ее регулярно, как сказано выше, пересевают на свежую твердую (плотную) среду.

Питательные среды и критерии качества исходного сырья

Для выращивания объектов биотехнологии (микроорганизмов, культуры тканей и клеток растений) применяют различные питательные среды. Для приготовления питательных сред в микробиологическом (биотехнологическом) производстве используют сырье минерального, растительного и животного происхождения, а также синтезированное химическим путем. Вещества, входящие в состав питательных сред, должны обеспечивать развитие культуры, биосинтез и накопление целевых продуктов и не должны содержать вредных примесей. Они могут быть жидкими, твердыми (плотными) и полутвердыми (полужидкими).

1. **Жидкие** среды готовят на основе водных растворов каких-либо веществ, чаще всего мясной воды, различных гидролизатов, иногда естественных продуктов (молока и др.)

2. Для получения **плотных** (твердых) сред к ним добавляют или агар, или желатин, или силикагель в соответствующей концентрации. Агар представляет собой полисахарид, получаемый

из морских водорослей. Он имеет плотную волокнистую структуру. Агар плавится при 100°C , но при охлаждении сохраняет жидкую консистенцию до $+45^{\circ}\text{C}$. Его в плотные среды добавляют в концентрации 1,5-3,0 %.

3. **Полужидкие** (полутвердые) среды имеют вязкую консистенцию благодаря добавлению к ним небольшого количества (0,3-0,7 %) агара.

По **происхождению** среды делятся на:

- Естественные (кровяные, молочные, картофельные, яичные и др.);
- Искусственные, получившие широкое применение. Они представляют собой искусственные, сбалансированные смеси питательных веществ в концентрациях и сочетаниях, необходимых для поддержания роста и размножения микроорганизмов. В них в качестве универсального источника азота и углерода применяют пептоны – продукты неполного расщепления белков с помощью ферментов (пепсина), различные гидролизаты (рыбный, казеиновый, дрожжевой и т.п.). Часто в них вводят предшественники роста, ПАВ, антибактериальные препараты.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. Они должны содержать в достаточном количестве все необходимые питательные вещества (источники энергии, азота, углерода), соли и ростовые факторы (микроэлементы и витамины).
2. Питательные среды должны иметь оптимальное для роста данного вида биообъектов значение рН.
3. Среда (твердые и полужидкие) должны иметь достаточную влажность, так как при усыхании повышается концентрация веществ, особенно солей, что может затормозить рост микроорганизмов.
4. Для лучшего определения культуральных свойств бактерий питательные среды должны быть, по возможности, прозрачными.
5. Питательные среды должны быть стерильными, не содержать посторонней микрофлоры.

При выборе компонентов питательных сред необходимо учитывать не только чистоту веществ (отсутствие вредных примесей), но также себестоимость исходных веществ и материалов.

По **назначению** питательные среды делятся на следующие категории:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| 1. Универсальные. | 5. Специальные. |
| 2. Дифференциально-диагностические | 6. Синтетические. |
| 3. Селективные. | 7. Полусинтетические. |
| 4. Дифференциально-селективные. | |

Питательные среды готовят по общепринятой схеме.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Подобрать наиболее рациональные составы питательных сред для различных групп микроорганизмов:

- А) для определения стерильности жидких лекарственных форм для внутреннего применения;
- Б) для идентификации одних видов бактерий от других по их ферментативной активности;

ЗАДАНИЕ 2. Правильно рассчитать количественный состав по предложенной прописи и написать приготовление плотной питательной среды в чашке Петри, а также в пробирке со скошенной поверхностью («косяк»). Выбрать способы стерилизации.

Состав простой плотной (агаризованной) питательной среды:

Пептона 1,0

Натрия хлорида 0,5

Агара 2,0

Воды очищенной до 100 мл.

Стерилизуют 30 минут при 120°C или 1 час при 100°C .

ЗАДАНИЕ 3. Расскажите приготовление и способ стерилизации синтетической питательной среды, применяемую в промышленности для выращивания муконовых грибов, синтезирующих липиды и каротиноиды.

ОҢТҰСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.12 из 72	

Состав синтетической жидкой питательной среды (соотношение C/N равно 40:1):

Глюкозы 6,0

Мочевина 0,2

Магния сульфата 0,05

Натрия хлорида 0,05

Калия фосфата однозамещенного 0,1

Дрожжевого экстракта 0,05

Железа сульфата двухвалентного 0,001

Воды очищенной до 100 мл

Значение pH среды 6,3-6,8

Растворы глюкозы и мочевины готовят отдельно, стерилизуют. Смешивают перед посевом культуры. Стерилизовать 30 минут при 120⁰ С или 1 час при 100⁰ С. Хранить не более 24 часов после смешения.

Во время выполнения заданий студенты должны теоретически обосновать природу и количество исходных компонентов и правильно указать условия стерилизации.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Что являются объектами биотехнологии? Каковы их особенности?
2. Дайте определение основным терминам: микроорганизм, культура, штамм и др.
3. Каковы методы расширения номенклатуры промышленных штаммов?
4. Как осуществляется индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор?
5. Каковы основные пути получения новых штаммов и на их основе – новых продуктов?
6. Как проводится сохранение культуры микроорганизма?
7. На какие группы делятся питательные среды и каковы критерии качества исходного сырья? Какие группы веществ вводятся в состав питательных сред?
8. Дайте характеристику источников углерода в составе питательных сред.
9. Дайте характеристику источников органического азота в составе питательных сред.
10. Каковы требования, предъявляемые к питательным средам?
11. На какие категории делятся питательные среды и в чем особенность каждой?
12. Дайте общую технологическую схему приготовления питательных сред.

Занятие № 3

Тема 3: Общая технологическая схема биотехнологического производства продуктов. Ферментационное оборудование. Контроль и управление технологическим процессом

Цель: Ознакомить студентов принципиальной технологической схемой биотехнологического производства целевых продуктов методом биосинтеза, ферментационного оборудования, контроля и управления технологическим процессом.

Задачи обучения

студент должен знать:

- особенности твердофазного культивирования;
- особенности и преимущества глубинного культивирования;
- ферментационное оборудование, типы ферментаторов, их принцип работы;
- принципиальную технологическую схему производства целевых продуктов биотехнологическим синтезом, основные стадии и операции;
- организацию асептики биотехнологического производства;
- условия проведения ферментаций;

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»	044/43-11- (2023-24) Стр.13 из 72
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий		

- возможности контроля, управления и оптимизации биотехнологических процессов

студент должен уметь:

- правильно составлять общую технологическую схемы производства получения биотехнологических продуктов из биомассы;
- правильно составлять общую технологическую схемы производства получения биотехнологических продуктов из культуральной жидкости;
- правильно подбирать способы выделения и очистки целевых продуктов из биомассы;
- правильно подбирать способы выделения и очистки целевых продуктов из культуральной жидкости;
- правильно подбирать ферментационное оборудование;
- регулировать рост биообъектов (микроорганизмов);
- правильно проводить контроль и управление биотехнологическим процессом.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Промышленная технология лекарств. Процессы и аппараты фармацевтического производства.
2. Перемешивание. Способы перемешивания. Оборудование.
3. Стерилизация. Методы и способы стерилизации. Применяемое оборудование.
4. Способы разделения жидких гетерогенных систем: фильтрование, центрифугирование, отстаивание. Применяемое оборудование.
5. Растворители и экстрагенты, их номенклатура, свойства, требования, предъявляемые к ним.
6. Теоретические основы экстрагирования высушенного и свежего сырья с клеточной структурой. Применяемое оборудование.
7. Способы первичной и глубокой очистки вытяжек из сырья с клеточной структурой. Способы получения индивидуальных веществ из суммы экстрактивных веществ. Применяемое оборудование, его устройство и принцип работы.

по теме занятия:

1. Методы биотехнологического культивирования биообъектов.
2. Особенности твердофазного культивирования.
3. Особенности и преимущества глубинного культивирования.
4. Ферментационное оборудование, типы ферментаторов, их принцип работы.
5. Принципиальная технологическая схема производства целевых продуктов биотехнологическим синтезом, основные стадии и операции.
6. Организация асептики биотехнологического производства.
7. Условия проведения ферментаций. Основные показатели, характеризующие ферментационный процесс.
8. Возможности контроля, управления и оптимизации биотехнологических процессов. Применяемое оборудование и приборы. Биодатчики и биосенсоры.
9. Регулирование роста биообъектов (микроорганизмов);
10. Выделение и очистка целевых продуктов из биомассы. Применяемое оборудование.
11. Выделение и очистка целевых продуктов из культуральной жидкости. Применяемое оборудование.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Высокая производительность биотехнологических способов производства целевых продуктов с заданными свойствами обусловлена способностью микроорганизмов, культуры тканей или клеток к интенсивному размножению, т.е. быстрому наращиванию биомассы. В результате этого происходит накопление целевых продуктов в биомассе или в культуральной жидкости.

По способу проведения глубинное культивирование различают:

- В периодическом режиме.
- Непрерывно в проточном режиме.

Глубинное культивирование проводят в аппаратах, называемых ферментаторами или ферментерами.

Ферментеры, используемые в периодическом режиме, делятся на:

- Барботажные;
- Эрлифтные (англ. – air – воздух, lift - поднимать).
- Барботажно-эрлифтные;
- С механическим перемешиванием;
- Барботажные с циркуляционным перемешиванием;
- С эжекционной системой и др.

При проведении глубинного культивирования непрерывно в проточном режиме используемые ферментеры по принципу действия делятся на:

- а) Хемостаты;
- б) Турбидостаты.

Условия проведения ферментаций

Для обеспечения проведения процесса ферментации необходимо строгое соблюдение таких условий, как качество питательной среды (состав), температура, аэрация, давление, перемешивание, рН среды, количество исходных клеток, свет.

Основные показатели, характеризующие ферментационный процесс:

1. Физические показатели: температура, давление, вводимая мощность, частота вращения мешалки, пенообразование, скорость потока воздуха (инертного газа), скорость потока питательной среды, вязкость, турбулентность, мутность и др.
2. Химические показатели: рН среды, окислительно-восстановительный потенциал, содержание растворимого O₂ и CO₂, содержание O₂ и CO₂ в подаваемом газе (воздухе), содержание углерода, содержание предшественников роста, содержание азота, фосфора, Mg⁺², K⁺, Ca⁺², Na⁺, Fe⁺², SO₄⁻² и др., концентрация синтезируемого продукта.
3. Биологические показатели: содержание субстрата, продукта, отсутствие посторонней микрофлоры.
4. Физическое состояние продуцента: удельная скорость роста, его морфологическое состояние (величина клетки, количество делящихся клеток), ряд биохимических показателей (содержание РНК, ДНК, NAD, NADH₂, АТФ, АМФ, активность ключевых ферментов).

Автоматизация процесса контроля за ферментацией (за перечисленными показателями), позволяет не только регистрировать анализируемые показатели, но и регулировать их.

Оптимизация биотехнологических процессов

Современный биотехнологический процесс немаловажен без применения ЭВМ для управления процессом ферментации, а именно для:

- Поддержания оптимального значения рН среды;
- Поддержания оптимальной температуры среды;
- Автоматического пеногашения;
- Регулирования частоты вращения мешалки;
- Контроля качества растворимого O₂;
- Контроля за удалением CO₂ из ферментера;
- Поддержания заданной скорости подачи субстрата и др.

ЭВМ используют для учета масштабного эффекта при оценке ферментационных параметров и поддержания их в оптимальном режиме, а также для проведения анализа при установлении влияния отдельных параметров на метаболическое поведение культур микроорганизмов. Процесс оптимизации требует *варьируемого параметра*, который надо оптимизировать. Удобными параметрами для вариаций служат (на выбор):

- общая продукция при ферментации в периодических условиях;
- образование продукта/ферментер · час;

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.15 из 72	

- концентрация продукта в выходящем потоке (ферментация в непрерывном режиме);
- стоимость тонны продукта, выходящего из ферментера;
- стоимость тонны экстрагируемого продукта.

Компьютерный контроль очень важен для дозируемого добавления сырья и общего потребления энергии. Это особенно важно для ферментаций, в которых субстрат и сырье составляют главную стоимость.

Преимущество компьютерного контроля – это также быстрое и эффективное управление параметрами процесса, хранение и воспроизведение нужных данных, большая гибкость работы завода в соответствии со спросом на продукцию, наиболее надежный контроль загрязненности и безопасности на производстве.

Общая (принципиальная) технологическая схема получения продуктов микробиологического синтеза состоит из ряда основных (ОТС) и вспомогательных технологических стадий (ВТС):

- ВТС – 1. Подготовка культуральной среды: составление композиции питательных веществ (витаминов, микроэлементов, углерода, азота, солей и др.) и стерилизация.
 ВТС – 2. Подготовка посевного материала (осуществляется в инокуляторе).

ОТС – 1. Культивирование (ферментация) биообъекта-продуцента.

ОТС – 2. Отделение биомассы от культуральной жидкости (осуществляется фильтрованием, центрифугированием, сепарированием).

Если целевой продукт содержится, в основном, в биомассе, то в дальнейшем идет переработка биомассы (1-й путь). Обычно в биомассе содержатся липиды, фосфолипиды, некоторые витамины, белки и др. Тогда в культуральной жидкости целевой продукт содержится в незначительных количествах и его выделение становится нерентабельным.

Если биосинтезируемый целевой продукт секретирует (переходит) из клеток во время ферментации, в основном, в культуральную жидкость (биосинтез внеклеточных продуктов), то в дальнейшем идет именно ее переработка (2-й путь). Обычно в культуральную жидкость из клеток выделяются антибиотики, ферменты и др. Тогда в биомассе содержание целевого продукта незначительное и проведение работ по его выделению становится нерентабельным.

1-й путь. Обработка биомассы:

ОТС – 3. Разрушение клеток микроорганизмов для выделения внутриклеточных целевых продуктов с их одновременным экстрагированием, то есть разрушение клеточных стенок идет в среде экстрагента. Осуществляется следующими способами:

- а) дезинтеграция (механическая, ультразвуковая);
- б) ферментативный лизис;
- в) химический лизис.

ОТС – 4. Отделение экстракта (центрифугирование, сепарирование, мембранная фильтрация).

ОТС – 5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью различных методов (этерификация, высаливание, чаще хроматографическими методами: колоночная адсорбция и др.)

ОТС – 6. Стандартизация целевого продукта.

ОТС – 7. Приготовление лекарственной формы (таблеток, инъекционных растворов в ампулах, стерильных порошков во флаконах и др.).

2-й путь. Обработка культуральной жидкости:

ОТС – 3. Концентрирование целевых продуктов в культуральной жидкости (ультрафильтрация, ионообменная хроматография, диализ).

ОТС – 5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью различных способов (этерификация, высаливание, чаще хроматографическими методами: колоночная, тонкослойная, ионообменная адсорбция и др.).

ОТС – 6. Стандартизация целевого продукта.

ОТС – 7. Приготовление лекарственной формы (таблеток, инъекционных растворов и др.).

На стадии ОТС – 4 (1-й путь) либо на стадии ОТС – 3 (2-й путь) для отделения раствора целевого продукта широко применяется мембранная фильтрация (или ультрафильтрация).

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.16 из 72	

Важную роль при очистке и выделении целевых продуктов играют хроматографические методы. При этом применяют:

- а) гель-фильтрацию или эксклюзивную хроматографию;
- б) ионообменную хроматографию;
- в) обращенно-фазовую или гидрофобную хроматографию;
- г) аффинную или лигандную хроматографию (наиболее перспективные методы).

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Определите вид сырья (биомасса или культуральная жидкость) наиболее целесообразный для выделения следующих биологически активных целевых продуктов:

- а) антибиотиков;
- б) липидов.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Что является объектами биотехнологии?
2. Каковы методы биотехнологического культивирования биообъектов?
3. В чем заключаются особенности твердофазного культивирования?
4. В чем заключаются особенности и преимущества глубинного культивирования?
5. Какое ферментационное оборудование вы знаете? Какие типы ферментеров применяются в биотехнологическом производстве, каков принцип их работы?
6. Каким путем осуществляется организация асептики биотехнологического производства?
7. Каковы основные условия проведения ферментаций?
8. Каковы основные показатели, характеризующие ферментационный процесс?
9. Каковы возможности контроля, управления и оптимизации биотехнологических процессов? Какое для этого применяется оборудование и приборы? Что такое биодатчики и биосенсоры?
10. Каковы возможности регулирования роста биообъектов (микроорганизмов)? С какой целью проводится регулирование роста биообъектов?
11. Дайте принципиальную технологическую схему производства целевых продуктов биотехнологическим синтезом. Покажите основные стадии и операции.
12. Как осуществляется выделение и очистка целевых продуктов из биомассы? Какое оборудование для этого применяется?
13. Как осуществляется выделение и очистка целевых продуктов из культуральной жидкости? Какое оборудование для этого применяется?
14. Какие виды лекарственных форм готовятся из целевых продуктов биотехнологического производства?

Занятие № 4

Тема 4: Приготовление посевного материала. Выделение чистых культур. Культивирование.

Методы биотехнологии: поверхностное и глубинное культивирование.

Цель: Ознакомить студентов с техникой выделения чистых культур, динамикой и кинетикой роста биообъектов, проводить их микроскопическое исследование.

Задачи обучения

студент должен знать:

- основные понятия и термины биотехнологии: культура микроорганизма, штамм, популяция, сверхпродуценты и др.;
- методы биотехнологии;
- основные компоненты питательных сред и критерии качества исходного сырья;
- технологию приготовления посевных (агаризованных твердых и полутвердых) сред;
- физиологические свойства микроорганизмов;
- морфологические признаки микроорганизмов;

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.17 из 72	

- спорообразование;
- биохимические свойства микроорганизмов;
- динамику роста микроорганизмов.

студент должен уметь:

- технологию выделения чистых культур микроорганизмов;
- приготовить посевные (агаризованных твердых и полутвердых) среды;
- выделять чистые культуры микроорганизмов;
- проводить микроскопическое исследование микроорганизмов: определять морфологические признаки, тинкториальные свойства и др.;
- регулировать рост биообъектов (микроорганизмов).

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы, грибы и др.
3. Технология приготовления питательных сред для микроорганизмов.
4. Способы микроскопирования биообъектов, применяемые приборы.

по теме занятия:

1. Методы получения и выделения чистой культуры микроорганизмов.
2. Динамика роста биообъектов. Факторы, позволяющие регулировать рост микроорганизмов и других биообъектов
3. Питательные среды, их составы, типы, критерии качества исходного сырья.
4. Микроскопическое исследование культивированных биообъектов.
5. Сохранение культуры.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Специфические и особенности микроорганизмов определили набор тех признаков и свойств, которые используются для их систематизации, классификации и идентификации.

1. Морфологические признаки – величина, форма, характер взаиморасположения.
2. Тинкториальные свойства – способность окрашиваться различными красителями. особенно важным признаком является отношение к окраске по Грамму, которое зависит от структуры и химического состава клеточной стенки бактерий. Морфологические свойства и отношение к окраске по Грамму определяют принадлежность к крупным таксонам - роду, семейству и т.п.
3. Культуральные свойства – особенности роста бактерий на жидких (образование пленки, осадок, помутнение) и плотных (форма, размер, консистенция, края, поверхность, прозрачность колоний, образование пигмента и другие свойства) питательных средах.
4. Спорообразование – форма и характер расположения споры в клетке.
5. Физиологические свойства – способы углеродного (аутотрофы, гетеротрофы), азотного (аминотрофы, аминокетотрофы) питания; тип дыхания (аэробы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы, микроаэрофилы).
6. Биохимические свойства – способность ферментировать различные углеводы, протеолитическая активность, образование индола, H₂S, наличие уреазы и других ферментов и т.д.
7. Химический состав клеточных стенок – содержание и состав основных сахаров и аминокислот.
8. Липидный и жирнокислотный состав – изучение состава жирных кислот проводят с помощью газовой хроматографии, которая обладает высокой разделительной способностью и чувствительностью.

Под **колонией** принято понимать видимую простым глазом изолированную структуру, образующуюся в результате размножения и накопления бактерий за определенный срок инкубации. Колония образуется обычно из одной родительской клетки или из нескольких идентичных клеток. Поэтому пересевом изолированной колонии может быть получена чистая культура микроорганизма.

Под **культурой** понимают всю совокупность бактерий, выросших на плотной или жидкой питательной среде. Как колония, так и чистая культура каждого вида характеризуется определенными признаками.

Основной и главный принцип бактериологии – во избежание ошибок изучать свойства только чистых, однородных культур.

Каждая выделенная культура данного вида бактерий называется также **штаммом**, то есть конкретным образцом данного вида.

Наиболее широко используемым методом выделения чистой культуры является метод Дригальского, который состоит в следующем: на поверхность чашки Петри с мясо-пептонным агаром (или какой-либо другой питательной средой) наносят петлей или пастеровской пипеткой небольшую каплю исследуемого материала. Стерильным шпателем каплю тщательно растирают по всей поверхности питательной среды, после чего тем же шпателем (не беря нового материала) делают посев еще на двух чашках. В результате такого посева на поверхности третьей чашки, а иногда и на второй вырастают отдельные колонии, которые после макро- и микроскопического изучения пересевают в пробирки с питательной средой.

Особенности роста популяции бактерий

Кинетика роста бактериальной популяции не устанавливается кинетикой роста индивидуальной клетки, хотя между ними, несомненно, существует взаимосвязь.

Среднюю валовую (абсолютную) скорость роста (V_{cp}) за отрезок времени ($t_1 - t_0$) можно определить по абсолютному приросту биомассы по формуле:

$$V_{cp} = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0},$$

где m_0 – величина биомассы в начале;
 m_1 – величина биомассы в конце исследованного отрезка времени.

Скорость роста микробной популяции не является величиной неизменной. В развитии популяции различают следующие последовательные стадии: лаг-фаза (фаза адаптации - I); лог- фаза (II, III, IV); стационарная фаза (накопление целевых продуктов - V); автолиз (VI, VII, VIII).

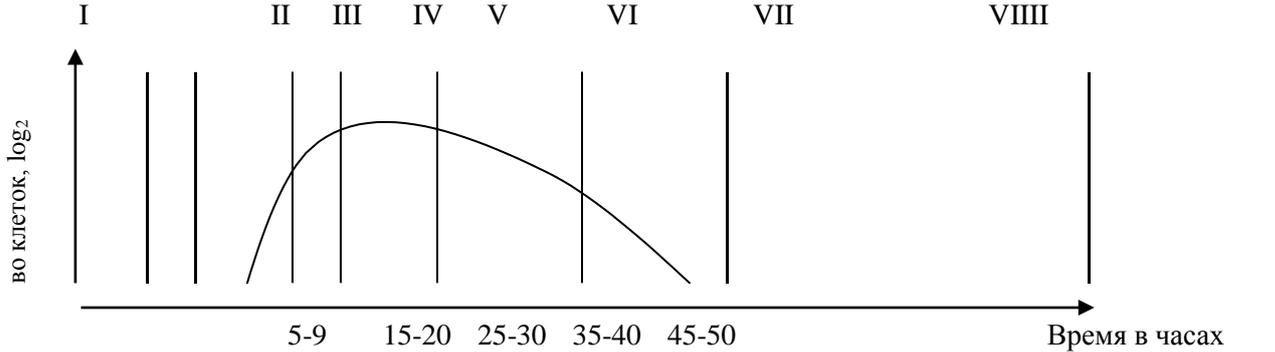


Рис. 1. Стадии роста периодической культуры

I – лаг-фаза; II – фаза положительного ускорения; III – фаза логарифмического роста; IV – фаза отрицательного ускорения; V – стационарная фаза; VI – фаза ускоренной гибели; VII – фаза логарифмической гибели; VIII – фаза уменьшения скорости гибели клеток

На оси ординат показана скорость размножения клеток, выраженная логарифмом от числа живых клеток на 1 мл среды.

Эти фазы отражают сложные процессы адаптации бактерий, привнесенных из одной среды обитания в другую, как правило, оптимальную для их размножения. Природа лаг-фазы во многом связана с тем, что в этот период происходит синтез всех компонентов белоксинтезирующей системы и прежде всего такого количества рибосом, которое позволило бы обеспечить

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.20 из 72	

Задачи обучения

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

- общие понятия молекулярной генетики: первичная структура гена, регуляторные и структурные части генов, «молчащие гены», генетический код и др.;
- перенос генетической информации, его механизм;
- методы генной инженерии: понятие о мутагенезе, виды мутагенов и механизм их действия, основные типы мутаций, преимущества и недостатки метода мутагенеза;
- метод отбора – скрининг мутантов, проблемы сохранения генетической стабильности ценных мутантов;
- сущность метода «клеточной» инженерии – гибридизации в селекции микроорганизмов;
- гибридную технологию: получение соматических гибридов высших организмов (растений, животных), их особенности, области применения, преимущества и недостатки;
- получение поликлональных и моноклональных антител;
- генетическую перестройку в опытах «in vivo»: методику проведения, преимущества и недостатки;
- общую характеристику плазмид;
- общее понятие о транспозонах;

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии и генной инженерии.

Основные вопросы темы:

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Строение микробной клетки (грибов, простейших, бактерий, вирусов).
3. Основы молекулярной генетики.
4. Технология готовых лекарственных форм: таблеток, растворов в ампулах, мазей и др.б) по теме занятия:
 1. Объекты биотехнологии, их особенности.
 2. Основы генной инженерии: общие понятия молекулярной генетики. Первичная структура гена.
 3. Регуляторные и структурные части генов. «Молчащие» гены.
 4. Перенос генетической информации (трансформация, трансфекция, конъюгация, трансдукция).
 5. Методы генной инженерии: мутагенез, метод отбора (скрининг мутантов). Виды мутагенов, механизм их действия. Основные типы мутаций. Проблемы сохранения генетической стабильности ценных мутантов.
 6. Метод генетической перестройки «in vivo»: метод слияния (гибридизация), его преимущества и недостатки. Общая характеристика плазмид. Общее понятие о транспозонах.
 7. Гибридная технология. Соматические гибриды высших организмов (растений, животных).
 8. Достижения генной инженерии и молекулярной биологии в области медицины, фармации и ветеринарии для лечения и профилактики болезней человека и животных.
 9. Состояние работ в области генной инженерии.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Одним из ведущих научно-практических направлений биотехнологии является генная (генетическая) инженерия. Выделение генной инженерии в 70-е годы XX века логически следует из ранее накопленных знаний. В развитии генетической инженерии определенную роль сыграли достижения молекулярной биологии, биологии клетки, ботаники, вирусологии, генетики микроорганизмов и химии за последние 30-40 лет. Это было связано с тем, что в микробиологической промышленности использовались в качестве продуцентов ценных продуктов малопродуктивные «дикие» микроорганизмы. Организация производства на основе этих штаммов

обычно нерентабельна. Речь идет о микроорганизмах, осуществляющих биосинтетические процессы, появление которых связано с открытием антибиотиков. Тогда встала задача создавать штаммы высокоэффективные, то есть способные синтезировать максимум продукта.

Ко времени открытия антибиотиков генетика обладала мощным средством перестройки генов – мутагенезом. Этот метод и был положен в основу всей селекционной работы с микроорганизмами, продуцентами различных продуктов биосинтеза: антибиотиков, аминокислот, витаминов, ферментов и др. Следует отметить, что эффективность отбора лучших продуцентов за 30-40 лет достигла высоких производственных результатов. Так, например, продуктивность по синтезу пенициллина увеличилась в 300-400 раз, лизина – в 400-450 раз. Полученные результаты позволили снизить себестоимость ряда биосинтетических продуктов до самой низкой отметки и сделали их широко используемыми в медицинской практике, ветеринарии, пищевой промышленности, в сельском хозяйстве.

Известно, что главенствующую роль в клетке играет ядро или его аналог у бактерий и условно – у вирусов.

Постоянным компонентом ядра (или нуклеотида) является ДНК, входящая в состав хромосом. Каждая хромосома содержит только одну молекулу ДНК, в которой в линейном порядке сгруппированы самовоспроизводящиеся дискретные единицы, или **гены** (цистроны – или первичные гены), обладающие элементарной биохимической функцией.

Первичная структура гена

Определенный ген в хромосоме может занимать один *локус* (лат. locus – место) со своим аллеломорфом.

Аллеломорфный ген – другая форма одного и того же гена. Обычно аллель дикого (нормального) типа доминантен по отношению к мутантному.

Мутация – это скачкообразное наследуемое изменение гена.

Ген состоит из нескольких тысяч пар нуклеотидов. Причем один нуклеотид или сотни и тысячи могут мутировать, являясь единицей мутации, или мутоном.

Единица рекомбинации (рекон) – это отдельный нуклеотид. Различают:

- ✚ *Операторы* - участки, локализованные на хромосомах по соседству со структурными генами, эти генетические элементы являются местом приложения действия репрессоров;
- ✚ *Оперон* – или группа сцепления структурных генов, находящаяся под контролем оператора.
- ✚ *Терминаторы*, это участки которые блокируют транскрипцию (переписывание) информации и прерывают синтез белка;
- ✚ *Промоторы (или инициаторы)*, это участки оперона, которые располагаются перед операторами и являются начальными точками транскрипции.
- ✚ *Операторы* - участки, локализованные на хромосомах по соседству со структурными генами, эти генетические элементы являются местом приложения действия репрессоров;
- ✚ *Оперон* – или группа сцепления структурных генов, находящаяся под контролем оператора.
- ✚ *Терминаторы*, это участки которые блокируют транскрипцию (переписывание) информации и прерывают синтез белка;
- ✚ *Промоторы (или инициаторы)*, это участки оперона, которые располагаются перед операторами и являются начальными точками транскрипции.

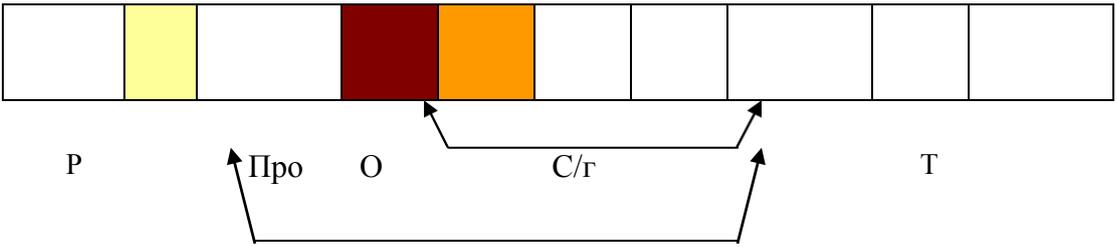


Рисунок 1. Р – ген-регулятор; Про – промотор; О – оператор; С/г – структурные гены; Т – терминатор

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.22 из 72	

Состав ДНК изменяется медленно, если, например, происходит замена отдельных оснований в результате мутаций. Эффект таких мутаций носит кумулятивный, или накопительный, характер. Неконтролируемые мутации происходили и происходят постоянно, без них жизнь на Земле могла бы остановиться, например, на уровне амёб или бактерий.

Известно, что генетическая информация, заложенная в ДНК (РНК), реализуется в процессе синтеза специфических белковых молекул.

Генетический код – это система эквивалентности в последовательности нуклеотидов и последовательности аминокислот, которая позволяет установить соответствие между полипептидной цепью и геном (цистроном). Набор из трех нуклеотидов – триплет, или кодон, соответствует определенной аминокислоте.

Практически оказалось, что конкретной аминокислоте может соответствовать более чем один кодон, в этом случае код называется вырожденным, а ген – «молчащим». Вырожденность кода проявляется в создании запаса генетической информации, страхующей клетку от случайных изменений в структуре ДНК.

Неоспоримо доказано, что код, в основном, универсален, то есть клетки различных видов организмов и организованные частицы (вирусы) имеют один и тот же «кодовый словарь», хотя в него внесены некоторые дополнения. Благодаря универсальности кода получила теоретическое и практическое развитие генная инженерия.

Генетическая информация переносится по схеме: ДНК РНК → → Белок

Допускается перенос информации от РНК к ДНК (например, у ретровирусов, вируса СПИДа), но никогда от белка к РНК.

Перенос генетической информации от ДНК к ДНК (или от РНК к РНК – у вирусов) называется репликацией или самоудвоением.

Понятие о мутагенезе

В основе мутагенеза лежит изменчивость микроорганизмов, под которой понимают разнообразие организмов, ныне существующих и вновь образующихся. Поэтому при работе с микроорганизмами используют в качестве объекта не одну особь, а популяции.

Популяция – многочисленные клетки (особи) одного вида, обитающие в ряду поколений в определенных условиях, где нет заметных преград для случайного свободного скрещивания этих клеток. Микроорганизмы в популяции характеризуются общностью генетической программы и возможностью свободного обмена генетической информацией.

Характерные показатели популяции:

- плотность – число особей на единицу объема или площади;
- прирост – число новых особей, возникающих в единицу времени;
- гибель – число особей, гибнущих в единицу времени.

Изменение численности популяции выражается кривыми размножения или кривыми выживания.

Культура микроба называется чистой, если родительские и дочерние особи практически неразличимы и между ними нельзя установить родственные связи. Чистые культуры (как популяции) мало или совсем непригодны для генетических исследований, которые выполняются, в основном, на клоновых культурах.

Клон – это культура, состоящая из наследственно однородных клеток, возникающих в результате бесполого размножения. Однако клоновые культуры грибов (одноклеточных низших) трудно получить, так как их клетки могут быть многоядерными.

Мутация – это генетическое и необратимое изменение нормы реакции организма.

Норма реакции организма – это проявление фенотипа в разных условиях существования вида.

Фенотип – это определенная сумма признаков организма в конкретных внешних условиях.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.23 из 72	

Виды мутагенов:

Химические мутагены: производные этилена, уретаны, алкилсульфонаты, иприты, этиленимины и др.;

Физические мутагены: излучения (ионизирующие – β и γ ; ультрафиолетовое), ультразвук, повышенная температура и др.;

Биологические мутагены: вирусы бактерий (фаги).

Клетки, наследственно изменившиеся под влиянием мутагенов, называются мутантными, а культуры, полученные из них – мутантами.

Мутации по механизму возникновения могут быть:

- Индуцированные (контролируемые);
- Спонтанные (неконтролируемые или ненаправленные). Они имеют место в естественных условиях без вмешательства экспериментатора.

Адекватность генотипического изменения клеток условиям среды обитания оценивается в ходе естественного отбора при адаптации, так как мутанты могут быть жизнеспособными и нежизнеспособными.

Типы мутаций:

- Ненаследуемые модификации;
- Длительные наследственные фенотипические модификации. Они присущи только клеточным структурам, но не вирусам.

Микробы, как высшие организмы, способны собирать и перераспределять уже имеющуюся наследственную информацию между родственными, но генетически неидентичными клетками. Процесс комбинирования в одной клетке мутировавших генов из двух разных клеток называют генетической рекомбинацией. Она наблюдается при трансформации, трансфекции, конъюгации и трансдукции.

При этом не происходит истинного слияния клеток, и лишь часть генетического материала переходит в клетку-реципиент. Образуется неполный, или частичный, диплоид - мерозигота (частичная зигота).

Трансформация – это процесс, при котором осуществляется перенос информации химически чистой ДНК от бактериальной клетки-донора в бактериальную клетку-реципиент, где в результате рекомбинации происходит замещение специфической последовательности генома.

Трансфекция – это процесс, при котором информация переносится в компетентную бактериальную клетку, когда она поглощает ДНК фага. Процесс поглощения ДНК фага компетентной клеткой при трансфекции сходен с процессом трансформации, однако они существенно различаются, поскольку фрагментация ДНК происходит только при трансфекции. Процесс идет естественным путем подобно заражению клеток фаговыми частицами.

Конъюгация (лат. conjugatio – соединение – это процесс полного или частичного переноса генетической информации из мужской особи в женскую при установленном клеточном контакте между разнополюми клетками бактерий.

Трансдукция – это процесс переноса ДНК из бактериальной клетки-донора в фагочувствительную клетку-реципиент с помощью фага. Фаг выступает посредником между донорской и реципиентной клетками.

Мутантные клетки предварительно размножают в присутствии ингибиторов роста (здесь используется метод отбора – скрининг). Затем отбирают лишь те мутанты (по форме и размерам колоний), которые преодолевают нарушение обмена веществ за счет образования (синтеза) избытка желаемого соединения (целевого продукта).

Гибридизация – как основной метод биотехнологии

В биотехнологии широко используется метод получения гибридных клеток на основе слияния микробных протопластов (парасексуальная гибридизация). Этот уровень биотехнологии называется «клеточной» инженерией. Таким путем удается повысить потенциальную активность исходных клеток в гибридном потомстве.

С помощью скрининга (отсева, просева) мутантов отбираются клетки, у которых наблюдается достаточно длительные модификационные изменения, обусловленные включением в стабильные метаболические циклы.

Гибридизация (лат. *hibrida*–скрещивание, помесь) стала применяться для объединения желаемых свойств разных штаммов в одном микроорганизме. Обычно скрещивают штаммы, принадлежащие к противоположным типам.

У бактерий половой процесс называется конъюгацией (см. выше). Это способ переноса генетической информации из одной бактериальной клетки в другую. Он осуществляется за счет образования длинного мостика между клетками, который служит для переноса ДНК из одной клетки в другую.

Половой процесс бактерий при конъюгации контролируется системой несовместимости.

Способность к формированию мостика закодирована во многих плаزمиды бактерий, по нему они переносят свои гены, а в некоторых случаях и гены клетки-хозяина (клетки-донора) в клетку-реципиент. Плазмиды, осуществляющие перенос генов клетки-хозяина, обладают, таким образом, способностью к мобилизации хромосом. У клеток *E. coli* такие F-плазмиды выступают в роли фактора пола. Они способны мобилизовать хромосому не только *E. coli*, но и родственных энтеробактерий (*Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Erwinia*), и поэтому могут использоваться для переноса генов между бактериями разных родов.

У разных видов *Streptomyces* хорошо развиты системы скрещивания, что позволяет получать свыше 60 % наименований применяющихся сегодня антибиотиков, особенно у их близких родственников – видов *Nocardia* (они синтезируют рифамицины). Для повышения выхода антибиотиков, синтезируемых *Penicillium* и *Cephalosporium*, применен парасексуальный цикл гибридизации.

У грибов помимо конъюгации (слияние содержимого вегетативных клеток) существуют другие типы скрещивания, так как многие микроскопические грибы не имеют истинного полового цикла. В этом случае применяется парасексуальный цикл (слияние протопластов), но он менее эффективен.

Гибридная биотехнология

Гибридома – это клетка, которая получена в результате гибридизации.

Соматические гибриды высших организмов

1. Получение соматических гибридов растительных клеток

Для осуществления гибридизации соматических клеток растений методом слияния протопластов (метод применяется в культуре тканей и клеток растений – см. Лекцию № 10) необходимо выполнить следующие операции:

1. Выделить протопласты;
2. Осуществить слияние;
3. Регенерировать клеточные стенки;
4. Осуществить слияние ядер так, чтобы получить полноценное гибридное ядро;
5. Размножить гибридные клетки;
6. Регенерировать целое растение.

Осуществить слияние протопластов растений, вообще говоря, несложно. Представляет трудности процесс размножения гибридных клеток и регенерация целого растения. Однако в настоящее время уже получены мутантные растения – соматические гибриды.

2. Слияние клеток животных

Осуществить слияние клеток животных и получить внутри- и межвидовые гибриды клеток млекопитающих методически проще, чем в случае микроорганизмов или растений, так как клетки млекопитающих не имеют клеточной стенки, которую необходимо удалять перед слиянием.

Следует помнить, что при слиянии клеток растений получается гибридное растение, а при слиянии клеток млекопитающих – лишь гибридная клетка.

Гибридизация лежит в основе получения моноклональных антител.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.25 из 72	

Моноклональные и поликлональные антитела

Еще до разработки технологии гибридом (гибридома – это клетка, получаемая гибридизацией, слиянием двух клеток в результате конъюгации или другим путем), позволяющей получать гомогенные (моноклональные) антитела, большое влияние на развитие клинической медицины оказали «обычные» (поликлональные) антитела. При этом наработка подходящих антител всегда осложнялась непредсказуемостью иммунного ответа, и их титр, как и перекрестные реакции, варьировали от животного к животному и от одной партии сыворотки к другой. Это определялось тем, что данный антиген вызывает образование целого набора антител.

Антитела – это гликопротеиды, образующиеся в ответ на введение антигена. Они относятся к классу иммуноглобулинов, обладают общностью строения и отличаются способностью связывать различные антигены. В медицинской практике применяются антитела γ -класса (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD).

Один из результатов использования метода слияния клеток млекопитающих чрезвычайно быстро нашел применение в биотехнологии – это линии клеток, полученных при гибридизации с участием клеток миеломы (так называемые «гибридомы»), с помощью которых могут вырабатываться моноклональные антитела. Этот метод разработан Мильштейном с соавт. в Кембридже. Он основан на создании «бессмертных» клеток, то есть клеток нормальных лимфоцитов, обуславливающих иммунный статус организма, производящих антитела, за счет слияния их с клетками миеломы*. Таким способом получают моноклональные антитела только одного типа в каждом конкретном случае. Область их применения различна: в диагностике вирусных и онкологических заболеваний; в определении (идентификации) возбудителей инфекционных заболеваний; при пересадке органов; при очистке белков методом иммуно-адсорбции; при очистке интерферонов и т.п.

Примечание: Миелома* - это злокачественные новообразования иммунной системы; они развиваются в результате неконтролируемой пролиферации линии лимфоцитов. При этом в больших количествах синтезируется один тип миеломных белков-антител, или так называемых аномальных иммуноглобулинов. Миеломные белки – удобная мишень для структурного изучения антител, так как они представляют собой структурно-гомогенные антитела, вырабатываемые опухолевыми плазматическими клетками – потомками одной злокачественно-перерожденной клетки. Иными словами, миеломы являются природными продуцентами моноклональных антител.

В основе получения моноклональных тел, как сказано выше, лежит гибридная технология (уровень «клеточной» инженерии). Здесь осуществляется гибридизация β -лимфоцитов (выделенных из периферической крови, миндалин или селезенки человека) и клеток миеломы млекопитающих (мышей, крыс, человека). Слияние достигается с помощью, например, полиэтиленгликоля. Полученная гибридома способна продуцировать так называемые моноклональные антитела. В производствах антител биотехнологический процесс рассчитан на использование метода выращивания гибридных клеток в инкапсулированном виде. При достижении клетками определенной плотности в капсулах антитела выделяются и очищаются с помощью простейших процедур. Таким способом можно получать практически неограниченное количество гомогенных (моноклональных) антител.

Генетическая перестройка «in vivo»

Говоря об истории развития генетической инженерии, следует сказать, что сама идея о выделении специальных фрагментов ДНК (генов) была осуществлена в экспериментах «in vivo» в 1969 г. Бэквитцем Дж. и Шапиро И. Ими были выделены лактозные гены E. coli в химически чистом виде. Генная инженерия берет начало с 1972 года, когда П. Берг со своими коллегами (США) создали первую рекомбинантную ДНК. Со времени выделения Дж. Бекуитом (Дж. Беквитц) с сотр. химически чистого лактозного гена E. coli удалось включить в наследственный аппарат микробных клеток гены инсулина, соматотропного гормона человека (гормона роста) и др.

Большую роль в становлении генетической инженерии сыграло также установление модели репликации, впервые сформулированной Жакобом, Бреннером и Кузэн. Было обнаружено, что каждая генетическая структура, будь то хромосома, плазмида или бактериофаг, составляет единицу репликации – репликон. Эта гипотеза позволила объяснить, почему перенесенные в клетку при

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.26 из 72	

трансформации или трансдукции фрагменты ДНК не способны самостоятельно реплицироваться, если не включаются в хромосому и не подпадают под контроль его собственного аппарата репликации. Клонирование посторонних генов в составе плазмиды или фаговой ДНК обеспечивается собственным аппаратом репликации. Такие молекулы, несущие собственный аппарат репликации, были названы векторами (vehicle – вектор).

Многие свойства бактерий, как было сказано ранее, интересные с точки зрения биотехнологии, кодируются плазмидами.

Плазмиды – это кольцевые молекулы ДНК, которые стабильно передаются потомству бактериальных клеток независимо от хромосомной ДНК. В генной инженерии плазмиды используются для клонирования нужных генов. Молекулярная масса плазмид – от 100 до 200000. Самые маленькие плазмиды кодируют 1-2 белка среднего размера, более крупные – 300 и более белков.

С целью преодоления преград для генетического обмена, существующих в обычных системах скрещивания, был использован метод слияния протопластов (клеток с удаленными клеточными стенками).

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Ответить на тестовые вопросы по предложенным вариантам.

ЗАДАНИЕ 2. Самостоятельная работа студентами выполняется письменно под непосредственным контролем преподавателя. Во время выполнения заданий студенты должны правильно подобрать ответы по тестовым заданиям и дать устное теоретическое обоснование.

После выполнения задания студенты должны представить тетради на проверку преподавателю.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: Устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение общим понятиям молекулярной генетики: Что представляет собой первичная структура гена и из каких частей она состоит?
2. Какова функция регуляторных генов?
3. Какова функция структурных генов?
4. Дайте определение следующих понятий: оператор, оперон, терминатор, промотор.
5. Что понимают под «молчащими генами»?
6. Что представляет собой генетический код?
7. В каком направлении переносится генетическая информация?
8. Каковы механизмы переноса генетической информации? Что такое трансформация? Что такое трансфекция? Каков механизм конъюгации? Что такое трансдукция?
9. Дайте определение популяции? Каковы основные ее характеристики?
10. Дайте определение следующим понятиям: чистая культура микроба, клон?
11. Дайте определение понятию мутации. Что такое норма реакции организма? Что такое фенотип?
12. Какие виды мутагенов вы знаете? Дайте им краткую характеристику.
13. По механизму возникновения какие мутации вы знаете?
14. Какие основные типы мутаций вы знаете? Какие могут получаться при этом мутанты?
15. В чем заключается сочетание мутагенеза и метода отбора (скрининг)? В чем их преимущества и недостатки?
16. В чем заключаются проблемы сохранения генетической стабильности ценных мутантов?
17. В чем состоит сущность метода «клеточной» инженерии – гибридизации?

OŃTŪSTIK QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.27 из 72	

18. Дайте полную характеристику плазмид. В чем заключаются их отличия от вирусов?
19. В чем состоит сущность гибридной технологии? Как получаются соматические гибриды растений? Соматические гибриды клеток животных? В чем особенности и различия соматических гибридов клеток растений и животных?
20. Как получаются поликлональные антитела? В чем их недостатки?
21. Как получаются моноклональные антитела? Как они применяются?
22. В заключение генетическая перестройка в опытах «in vivo»: какова методика проведения? Каковы преимущества и недостатки?

Занятие № 6

Тема 6: Препараты аминокислот, методы получения, области применения. Культивирование и конструирование штаммов-продуцентов. Регуляция биосинтеза.

Цель: Ознакомить студентов с препаратами аминокислот, методами получения, области применения, культивирования и конструирования штаммов-продуцентов.

Задачи обучения

студент должен знать:

- объекты биотехнологии; методы биотехнологии;
- значение аминокислот в различных отраслях народного хозяйства;
- преимущество микробиологического способа производства аминокислот;
- условия изменения системы регуляции обмена веществ у микроорганизмов-продуцентов аминокислот;
- понятие об ауксотрофных микроорганизмах;
- 1-й способ получения аминокислот в биотехнологическом производстве;
- 2-й способ получения микробных аминокислот;
- 3-й способ получения аминокислот микробным синтезом;
- применение аминокислот в медицине, формы выпуска препаратов аминокислот;
- понятие о пептидах и пептидных препаратах, их получение на основе гидробионтов.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии.

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

б) по теме занятия:

1. Развитие промышленного производства аминокислот биотехнологическим способом. Значение аминокислот в различных отраслях народного хозяйства.
2. Основные задачи поиска и получения новых штаммов-продуцентов аминокислот.
3. Преимущество микробиологического способа производства аминокислот.
4. Условия изменения системы регуляции обмена веществ у микроорганизмов-продуцентов аминокислот.
5. Понятие об ауксотрофных микроорганизмах.
6. Способы получения аминокислот в биотехнологическом производстве.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.28 из 72	

7. Применение аминокислот в медицинской практике, формы выпуска препаратов аминокислот.
8. Понятие о пептидах. Пептидные препараты.
9. Перспективы в производстве аминокислот и пептидных препаратов с использованием гидробионтов.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Аминокислоты широко применяются в медицине для терапии послеоперационных больных, при лечении заболеваний ЦНС, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, печени (серотонин, аспарагин, гистидин, глицин, глутамин и глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, тирозин, триптофан, фенилаланин, цистеин).

Промышленное производство аминокислот занимает отдельное место в биотехнологии. Ежегодное производство, например, глутаминовой кислоты в мире достигло 800 000 тонн, лизина – свыше 200 000 тонн. Ряд аминокислот является незаменимыми: валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин и широко применяются, наряду с другими аминокислотами в практической медицине.

Отдельные аминокислоты используются в пищевой промышленности в качестве питательных добавок (аланин, аспарагиновая кислота, глицин, лизин), антиоксидантов (цистеин), ароматических (глутаминовая кислота, глицин) и вкусовых веществ (глицин); в сельском хозяйстве - в качестве кормовых добавок (лизин, треонин); в химической промышленности - как исходные вещества при синтезе полимеров и производстве косметических средств

Аминокислоты можно получать как из природного сырья (главным образом, при гидролизе белков растений), так и путем химического, микробиологического и ферментативного синтеза. Если химический синтез дает продукт-рацемат (рацемат – сумма лево- и правовращающих изомеров), который требует дальнейшей обработки, то микробный синтез и ферментационная обработка позволяют получить оптически чистые аминокислоты.

В промышленном масштабе аминокислоты получают, в основном, экстракцией из белковых гидролизатов или очисткой продуктов метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий - *Corynebacterium* или *Brevi bacterium* spp. Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют мутагенез с последующим отбором штаммов-сверхпродуцентов определенных аминокислот, но такой способ получения штаммов требует много времени и эффективность его невелика. Альтернативные подходы - выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Например, генно-инженерный способ получения аминокислоты триптофана, синтезируемой *S. glutamicum*, одного из видов *Corynebacterium*. Для этого в клетки *S. glutamicum* дикого типа введена копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермента, лимитирующего синтез триптофана.

Высокий уровень биосинтеза триптофана достигают введением в клетки *S. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов: 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, антранилатсинтазы и антранилатфосфорибозилтрансферазы. В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E.coli*.

Секретом большинства производственных процессов с участие микроорганизмов является изменение условий среды, именно за счет этого достигается синтез избыточного количества желаемого продукта. Необходимого дисбаланса метаболизма можно добиться:

- а) путем эмпирического изменения таких факторов, как концентрация субстрата, pH среды, концентрации продукта;
- б) либо путем установления критических уровней содержания других веществ (ионов металлов, органических добавок) в среде.

1 способ. Для производства аминокислот бактерии стали использоваться с начала 50-х годов. Штаммы-продуценты постоянно улучшали генетическими методами, выделяя ауксотрофные мутанты и мутанты с измененными регуляторными свойствами, так как чтобы обеспечить образование аминокислот в больших количествах, в любом случае необходимо изменить систему регуляции обмена веществ. Для этого можно:

а) либо стимулировать потребление субстрата в некоторых путях биосинтеза и выделение аминокислот в среду;

б) либо подавить побочные реакции и процессы деградации аминокислот.

Образовывать аминокислоты способны бактерии многих родов: *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*, причем они настолько продуктивны, что производство становится рентабельным. Производство таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин, DL-аланин, L-глутамин, L-пролин при участии диких штаммов бактерий основано:

- либо на использовании присущих этим бактериям особенностей метаболизма;
- либо на стимуляции образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды.

Так, при изменении состава среды некоторые бактерии способны накапливать до 30 мг/л глутамата. Образование продукта увеличивается при добавлении β -лактамных антибиотиков (пенициллина, цефалоспорины С), ПАВ и жирных кислот. Путем изменения состава среды процесс ферментации, в ходе которого образуется L-глутамат, может быть переключен на синтез L-глутамина и L-пролина.

Ауксотрофные мутанты не могут образовывать ингибиторы соответствующего метаболического пути, так как у них отсутствуют определенная ключевая ферментативная реакция. Поэтому при выращивании мутантного штамма в среде с минимальным содержанием необходимого питательного компонента они способны образовывать избыточные количества вещества-предшественника или близких к нему метаболитов блокированной реакции. Ауксотрофные мутанты находят применение и в тех случаях, когда необходимо синтезировать соединения, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций. Так, L-аспартат является общим предшественником для L-лизина, L-треонина, L-метионина, L-изолейцина.

Получить ауксотрофные мутанты, способные накапливать конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза, например, L-аргинин, невозможно. В таких случаях приходится отбирать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, что позволяет получить повышенный выход конечного продукта. Такие мутанты известны под названием регуляторных; их отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот или же среди ревертантов ауксотрофов. Они ингибируют рост бактерий, обеспечивают биосинтез природных аминокислот и одновременно подавляют процесс их включения в белки. Так, *Brevibacterium flavum* по такому механизму продуцирует до 33 мг/л лизина. Для увеличения выхода продукта можно воспользоваться как ауксотрофией, так и дефектами регуляции одновременно.

Регуляторные мутанты можно получить путем трансдукции, проводя при этом отбор отдельных мутаций.

II способ. Аминокислоты можно производить из биосинтетических предшественников, что позволяет успешно «обходить» метаболический контроль (репрессию - подавление). В качестве предшественников могут выступать глицин, формальдегид, формиат, саркозин, холин или метионин. Для их конверсии, а также образования L-глутамата, L-метионина и ароматических аминокислот используются штаммы растущих на метаноле бактерий.

III способ. Синтез аминокислот с помощью ферментов. Для этого применяются такие ферменты:

- Гидролитические (гидролазы) – вызывают гидролиз белков до аминокислот;
- Лиазы (часто – в реакциях дезаминирования);
- Ферменты, пиридоксальфосфат. Это обычные коферменты, участвующие в метаболизме аминокислот;
- Дегидрогеназы аминокислот, например, лейцин- и аланиндегидрогеназы для катализа обратимых реакций дезаминирования;
- Глутаминсинтетаза позволяет получать с высоким выходом (до 92 мл.%) глутамин.

Аминокислоты применяются в медицине (вливания, таблетки), а некоторые их аналоги используются для лечения психических заболеваний, для улучшения мозгового кровообращения.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.30 из 72	

Пептиды - короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями. Природные пептиды любого происхождения универсальны, они оказывают защитное действие на организм млекопитающих, стимулируя работу одной из главных систем - иммунной. Ценным сырьем для получения полипептидов являются гидробионты. Первым препаратом гидробионтов был ган- глин, полученный в 1981 г. в НПО «Биомед» из ганглиев тихоокеанских кальмаров методом ультрафильтрационной очистки и выделения пептидов. Ганглин содержит 45 пептидных фракций. Иммуномодулирующие свойства ганглина определили его применение для устранения любых вторичных иммунодефицитов. Препарат оказывает регулирующее влияние на реакции клеточного и гуморального звеньев иммунитета и неспецифическую резистентность организма, усиливает функциональную активность макрофагов, стимулирующих образование, дифференцировку и функциональную активность Т-лимфоцитов, синтез специфических антител в сыворотке крови, уменьшает развитие аутоиммунных процессов, обладает антигистаминными, антисеротониновыми, противовоспалительными свойствами.

Ганглин зарегистрирован в качестве пищевой добавки для ветеринарии, корректирующей иммунодефициты и оказывающей положительное влияние на гемопоэз.

Препарат гидробионтов - молокин - получен из молок лососевых рыб; наряду с иммуно регулирующей активностью обладает гонадотропными свойствами.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Подберите способы выделения и очистки аминокислот, синтезированных микро организмами-продуцентами:

- а) при внутриклеточном накоплении целевого продукта;
- б) при внеклеточной секреции целевого продукта.

ЗАДАНИЕ 2. Подберите и опишите технологическое оборудование, применяемое для выделения и очистки аминокислот в соответствии с вариантом задания № 1.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: Устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Дайте краткую классификацию объектов биотехнологии.
2. Когда началось развитие промышленного производства аминокислот биотехнологическим способом? В чем заключается преимущество получения аминокислот биотехнологическим способом?
3. Каковы основные задачи поиска и производства новых аминокислот?
4. Дайте номенклатуру и характеристику аминокислот. Каковы их основные продуценты?
5. Каковы основные способы получения новых штаммов- продуцентов аминокислот?
6. Каковы условия изменения системы регуляции обмена веществ у микроорганизмов- продуцентов аминокислот?
7. Дайте общее определение понятию об ауксотрофных микроорганизмах.
8. Какие способы получения аминокислот в биотехнологическом производстве вы знаете? Дайте характеристику каждому способу.
9. Как применяются препараты аминокислот в медицинской практике, каковы формы выпуска препаратов аминокислот?
10. Что такое пептиды. Какие пептидные препараты вы знаете? Как их получают?
11. Каковы перспективы получения аминокислот и пептидных препаратов с использованием гидробионтов?

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.31 из 72	

Занятие № 7

Тема 7: Лекарственные препараты на основе свободных и иммобилизованных ферментов, витаминов и коферментов

Цель: Изучить способы получения лекарственных препаратов на основе свободных и иммобилизованных ферментов, витаминов и коферментов

Задачи обучения

студент должен знать:

- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации;

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии.

Основные вопросы темы:

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы, грибы и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

б) по теме занятия:

1. Биотехнология как наука, ее определение. Объекты биотехнологии, их особенности.
2. Развитие промышленного производства липидов биотехнологическим способом. Основные задачи поиска новых продуцентов для производства липидов.
3. Развитие промышленного производства витаминов биотехнологическим способом. Основные задачи поиска новых продуцентов для производства витаминов.
4. Номенклатура и общая характеристика витаминов.
5. Основные продуценты витамина В12. Их характеристика.
6. Основные продуценты витамина В2. Их характеристика. Понятие «сверхсинтеза»
7. Основные продуценты витамина С. Их характеристика. Особенности производства аскорбиновой кислоты.
8. Основные продуценты витамина Д2. Особенности производства β-каротина
9. Коферменты и ингибиторы ферментов (основные группы). Основные продуценты. Основные препараты и их применение.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Ферменты входят в состав всех клеток и тканей живых организмов и регулируют течение процессов, лежащих в основе жизнедеятельности организма. Разнообразие этих процессов свидетельствует о существовании большого количества ферментов. В настоящее время описано около 3000 ферментов, примерно 100 из них получены в кристаллическом виде. Промышленность выпускает свыше 50 индивидуальных ферментов и вдвое больше ферментных препаратов, представляющих собой смеси, содержащие кроме целевого продукта- значительное количество близких по физико-химическим свойствам белков.

Как и все белки, ферменты являются высокомолекулярными соединениями от 10 000 до 1 000 000. Они обладают малостойкой структурой, весьма чувствительны к изменениям рН среды и температуры. Для каждого фермента существует свой оптимум значения рН среды. Отклонение рН среды в ту или иную сторону ведет к снижению скорости ферментативной реакции. Оптимальное значение температуры для большинства ферментов – +20 - +40⁰С. Повышение температуры до 40-50⁰С, как правило, приводит к падению ферментативной активности и даже к полной денатурации белка.

В соответствии с современной классификацией все ферменты делят на 6 основных классов по типу катализируемой ими реакции:

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1. Оксидоредуктазы; | 4. Лиазы; |
| 2. Трансферазы; | 5. Изомеразы; |
| 3. Гидролазы; | 6. Лигаза (синтетаза). |

Большая часть выпускаемых в промышленности ферментов, в том числе и для здравоохранения, относится к классу гидролаз. Поскольку трудно получить ферменты в гомогенном состоянии, а существующие препараты содержат, кроме основного, и сопутствующие ферменты, то выпускаемые в промышленности ферменты классифицируют по основному, преобладающему компоненту:

- | | |
|--------------------|--------------------------|
| - амилолитические; | - целлюлозолитические; |
| - липолитические; | - протеолитические и др. |

Наиболее развита ферментативная промышленность в США, Японии, Великобритании, Германии, Дании, Нидерландах, Франции, России.

По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных клеток. Микробные клетки содержат или продуцируют более 2000 ферментов, которые катализируют биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Культуры микроорганизмов способны вырабатывать большое количество ферментов за короткое время с использованием дешевых исходных веществ. В биологических объектах ферменты находятся в фиксированном состоянии на поверхности различных клеточных структур и сохраняют свою активность в течение длительного времени. Многие из этих ферментов могут быть выделены и проявляют свою активность независимо от клетки.

Наименование конкретного ферментного препарата, полученного биотехнологическим способом, состоит из сокращенного названия микроорганизма-продуцента и окончания «-ин». Например, амилолитические ферментативные препараты, получаемые из культур микроорганизмов *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis*, называют соответственно: амил-ориз-ин (амилоризин) и амил-о-субтил-ин (амилосубтилин). Далее следует индекс, обозначающий способ выращивания микроорганизма и степень очистки ферментов от сопутствующих веществ. При поверхностном способе культивирования за названием ставят букву «П», при глубинном – «Г».

Для промышленного производства лекарственных препаратов представляют интерес источники, которые доступны и позволяют получать ферменты с высокой активностью в коммерческих количествах. Такими источниками являются микроорганизмы.

Промышленное производство ферментных препаратов осуществляется, в основном, с помощью плесневых грибов, бактерий, дрожжей, актиномицетов. В последние годы используют в основном мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Rhizopus*, а также бактерии рода *Bacillus*, *Escherichia coli* и др. Они способны продуцировать большое число разнообразных по своему составу ферментов. Это обусловлено специфическими способностями их ферментативного аппарата, высокой способностью к размножению и адаптации в различных условиях окружающей среды.

О препаратах террилитин, ораза, солизим, стрептолиаза, стрептодеказа, аспарагиназа, пенициллиназа написано в учебнике «Технология лекарственных форм», глава 19 «Ферменты микробиологического синтеза. Имобилизованные ферменты» (под ред. проф. Л.А.Ивановой), том 2, 1991, стр. 476-483.

Микробные ферментные препараты широко применяются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве (растениеводстве, животноводстве, птицеводстве, рыбном хозяйстве и др.). По назначению ферментные препараты различают с помощью индексов: ферменты для пищевой промышленности обозначаются индексом Г10х, для ветеринарии – индексом Г3х. Так, применяемые в производстве вин, соков, пива для гидролиза крахмалсодержащего сырья ферментные препараты глюконаза Г10х, амилосубтилин Г10х и др., получают из различных штаммов *Bac. subtilis*.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.33 из 72	

Для ветеринарии также получают ряд биотехнологических препаратов (вакцин, сывороток, лечебных средств):

- колитин ГЗх - ферментный препарат получают глубинным культивированием *Aspergillus species* для лечения и профилактики болезней ЖКТ животных и птиц (колибактериоз, сальмонеллез и др.);
- стрептолитин ГЗх - (с помощью *Streptomyces species*) применяется для профилактики и лечения эндометритов у коров, а также для получения из мясных отходов белковых гидролизатов, используемых в микробиологической промышленности;
- лизоцим ГЗх - компонент мультиэнзимной композиции для стимуляции роста цыплят, а также для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ животных и птиц.

В технологии рекомбинантных ДНК для расщепления двуспиральных молекул ДНК применяются различные ферменты. Широкое применение получили рестриктазы. Так, поли- ДНК-(дезоксирибонуклеотид)-лигаза или ДНК-лигаза и др. применяются в геномной инженерии и для синтеза высокополимерных поли-дезоксирибонуклеотидных цепей с контролируемой последовательностью нуклеотидов.

Полученные биотехнологическим способом ферменты уреазы, лизиндекарбоксилаза и др. используются в клинико-диагностических лабораториях для анализа биологических жидкостей. В ходе ферментации микроорганизмов-продуцентов ферментов в питательную среду вводятся предшественники роста и биосинтеза. Так, введение аминокислот инициирует биосинтез соответствующих декарбоксилаз. Введение в среду аргинина индуцирует синтез аргиназы. Наличие в среде культивирования различных биополимеров обуславливает одновременное накопление комплекса протеаз, амилаз, нуклеаз, липаз. Наличие в среде большой концентрации мочевины стимулирует биосинтез уреазы. На рост микроорганизмов и биосинтез ферментов существенное влияние оказывают ионы кальция, магния, марганца, цинка и др. ионы железа и магния активируют и стабилизируют протеолитические ферменты. Продукты ферментов, относящиеся к строгим анаэробам, требуют полностью бескислородных условий культивирования очень богатых, полноценных сред. Процесс культивирования в этом случае можно проводить в более простых ферментерах, так не нужна аэрация и перемешивание. Таким образом, оптимизация питательных сред и условий культивирования для обеспечения направленного био- синтеза продуктом целевых продуктов является важным этапом разработки биотехнологических процессов получения высокоочищенных ферментов. Преимущественный биосинтез культурой нужного продукта с минимальным содержанием посторонних белков позволяет в дальнейшем существенно упростить выделение и очистку ферментов.

Полученные ферментные препараты стандартизуют, определяя ферментативную активность. Активность ферментов выражается в Международных единицах (МЕ) или единицах действия (ЕД).

МЕ - это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 минуту.

ЕД - это условная единица, величина которой указывается в частных статьях.

Удельная активность препарата - выражается в единицах ферментативной активности фермента (МЕ или ЕД) на 1 мг препарата и на 1 мг белка (вторая величина характеризует чистоту препарата).

Доза выражается в единицах ферментативной активности (МЕ или ЕД) на единицу лекарственной формы.

Высокая лабильность ферментов к различным факторам окружающей среды (значению pH, температуре), быстрая инактивация в организме и выделение из организма, наличие анти- генных свойств чужеродных организму белков в значительной мере могут быть устранены при использовании ферментов в иммобилизованном виде.

Иммобилизация ферментов - это повышение их стабильности. Существуют различные способы физической (адсорбция на нерастворимом носителе, включение в гель, микрокапсулирование, включение ферментов в липосомы и др.) и химической (с помощью ковалентного связывания, металлохелатный способ) иммобилизации. Их проводят в строго

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.34 из 72	

асептических условиях, но ни один из существующих способов иммобилизации биологически активных молекул, таких, как ферменты, антигены, антитела, не является универсальным. Подробнее о методах и способах иммобилизации написано в учебнике «Технология лекарственных форм», глава 19

«Ферменты микробиологического синтеза. Иммобилизованные ферменты» (под ред. проф. Л.А.Ивановой), том 2, 1991, стр. 476-483. С технологией микрокапсулирования вы также ознакомились при изучении курса «Заводской технологии лекарств» в 8-м семестре, теорию можно повторить в учебнике «Технология лекарственных форм», глава 11, раздел 11.4 «Микрокапсулирование» (под ред. проф. Л.А.Ивановой), том 2, 1991, стр. 238-243.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Провести определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом для препаратов:

А) Террилитин;

Б) α -Амилаза;

В) Пенициллиназа.

Методика определения белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом

Ферменты по своей сути представляют собой белки. Белки - высокомолекулярные природные органические вещества, построенные из L-аминокислот.

Для количественного определения белка используют колориметрические и спектрофотометрические методы, в некоторых случаях пользуются определением белка по содержанию общего азота в препарате.

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса ионов двухвалентной меди и пептидными связями молекулы белка.

Биуретовую реакцию нельзя проводить в присутствии солей аммония из-за образования медно-аммиачных комплексов.

1 мл раствора препарата, содержащего 1-10 мг испытуемого белка, помещают в пробирку, прибавляют 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре.

Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны в диапазоне от 540 до 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь этих же реактивов без препарата.

Калибровочный график строят в пределах концентраций от 1 до 10 мг стандартного объема белка, измеряя оптическую плотность растворов при выбранной длине волны.

Приготовление биуретового реактива. 0,75 г меди сульфата и 3 г натрия-калия тартрата растворяют в 250 мл воды в мерной колбе вместимостью 1 л, затем при энергичном перемешивании прибавляют 150 мл 10 % раствора едкого натрия, свободного от углекислоты, 1 г калия йодида, перемешивают и доводят объем водой до метки. Раствор хранят в емкости из полиэтилена.

ЗАДАНИЕ 2. Решить ситуационную задачу:

Получение субстанции аскорбиновой кислоты является многостадийным процессом, в котором сочетаются методы органического и микробиологического синтеза.

Какой предшественник аскорбиновой кислоты получают с использованием биотехнологии и каково значение этого этапа для всего процесса в целом?

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Что являются объектами биотехнологии?
2. Дайте определение ферментов как белковых соединений и общую характеристику.
3. Каковы правила формирования названий ферментных препаратов и их индексации?

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.35 из 72	

4. Дайте номенклатуру лекарственных ветеринарных, диагностических ферментных препаратов, получаемых биотехнологическим синтезом.
5. Дайте общую принципиальную технологическую схему получения внутриклеточных и внеклеточных ферментов.
6. Дайте характеристику основному ферментационному и технологическому оборудованию биотехнологических производств.
7. Назовите основные группы предшественников роста продуцентов и биосинтеза ферментов. Как они влияют на биосинтез ферментов?
8. Как стандартизируются ферментные препараты?
9. Каковы причины, обуславливающие необходимость иммобилизации ферментных препаратов?
10. Какие способы физической иммобилизации вы знаете? Как они осуществляются?
11. Какие способы химической иммобилизации вы знаете? Как они осуществляются?
12. Какие готовые лекарственные формы приготавливают на основе ферментных препаратов?

Занятие № 8

Тема 8: Получение лекарственных и диагностических препаратов на основе иммунобиотехнологии.

Цель: Ознакомить студентов с получением лекарственных и диагностических препаратов на основе иммунобиотехнологии.

Задачи обучения

студент должен знать:

- общее определение иммунитета, понятие о чужеродных агентах;
- виды иммунитета, в том числе виды антимикробного иммунитета;
- механизм иммунного ответа: фагоцитоз завершённый и незавершённый;
- специфический фактор защиты - выработка антител на чужеродные агенты;
- диагностикумы: моноклональные антитела, области их применения;
- резистогены и биосенсоры;
- вакцины, классификацию и технологию их получения;
- токсины, их особенности.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии и генетической инженерии.

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Строение микробной клетки (грибов, простейших, бактерий, вирусов).
3. Основы молекулярной генетики.
4. Технология готовых лекарственных форм: таблеток, инъекционных растворов и лиофильных порошков в ампулах и флаконах и др.

б) по теме занятия:

1. Объекты биотехнологии, их особенности.
2. Общее определение иммунитета, понятие о чужеродных агентах.
3. Виды иммунитета, в том числе виды антимикробного иммунитета.
4. Механизм иммунного ответа: фагоцитоз завершённый и незавершённый.
5. Гуморальные факторы неспецифического общего иммунитета.
6. Специфический фактор защиты - выработка антител на чужеродные агенты.

7. Диагностикумы: моноклональные антитела, области их применения.
 8. Резистогены и биосенсоры.
 9. Вакцины, классификацию и технологию их получения.
 10. Токсоиды, их особенности.
 11. Достижения генной инженерии и молекулярной биологии в области медицины, фармации и ветеринарии для лечения и профилактики болезней человека и животных.
- Состояние работ в области генной инженерии.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Понятие об иммунобиотехнологии

Иммунитет – (лат. Immunitas – освобождение от чего-либо) – врожденная или приобретенная способность макроорганизма к защите, специфически направленная против любых генетически чужеродных для него агентов. Такими агентами являются:

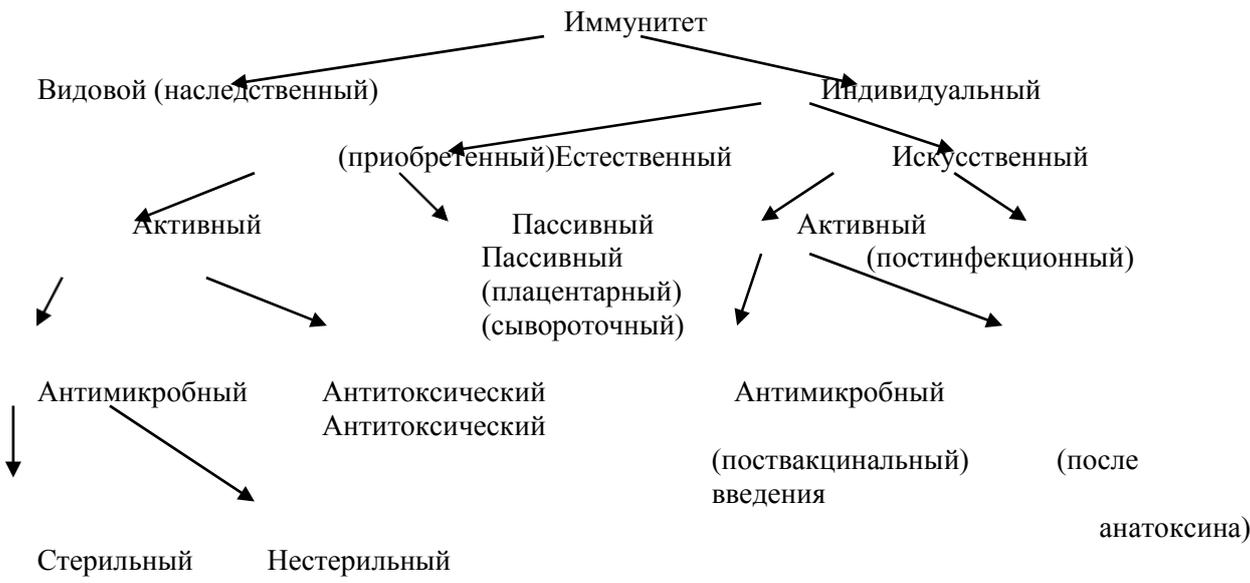
- 1) разнообразие клетки микро- и микроорганизмов, в том числе измененные клетки собственного организма;
- 2) структурные компоненты вышеуказанных клеток – белки, высокомолекулярные полисахариды, гликоконъюгаты (гликопротеины, пептидогликаны, липополисахариды и др.), проявляющие свойства антигенов.

Виды иммунитета:

1. Противомикробный (см. схему 1).
2. Антитоксический – против токсинов, вырабатываемых некоторыми бактериями (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Corynebacterium diphtheriae* и др.), растениями (клещевина - *Rhiscinus communis*), пресмыкающимися, животными (змеями, например, гадюка обыкновенная и др.).
3. Антитрансплантационный – против чужеродных тканей при пересадке или при переливании крови.

Иммунитет функционально направлен на уничтожение клеток и веществ, генетически отличающихся от собственных, и на сохранение постоянства внутренней среды макроорганизма в течение всей его жизни.

Схема 1. Виды противомикробного иммунитета



Механизм иммунного ответа – чаще всего воспалительный процесс, то есть защитно-приспособительная реакция клеток организма на действие микробов, продуктов их жизнедеятельности и других факторов. Основным механизмом воспалительного процесса,

обеспечивающим борьбу с микроорганизмами, является *фагоцитоз* («пожирание клетками», греч. phagos – поедание). Явление фагоцитоза было открыто И.И. Мечниковым (1892). Фагоцитоз осуществляется макрофагами крови, селезенки, печени, костного мозга, плевры, брюшины, костей.

Если происходит внутриклеточное переваривание микроорганизмов, то речь идет о завершенном фагоцитозе. Если идет внутриклеточная секвестрация (инкапсулирование), в случае неперевариваемости материала, то говорят о незавершенном фагоцитозе. Это характерно для туберкулезных палочек, бруцелл, гонококков, грибов рода *Cryptococcus Histoplasma*, которые могут не только сохранять свою жизнеспособность, находясь внутри микро- и макрофагов, но и активно размножаться в них, приводя их к гибели. Это связано с высокой устойчивостью вирусов к лизосомальным протеазам и другим ферментам фагоцитирующих клеток.

К гуморальным факторам неспецифического общего иммунитета относятся:

- а) бактерицидные вещества крови:
 - лейкоцины, выделяющиеся из лейкоцитов;
 - эритроин, выделяющийся из эритроцитов;
- б) нормальные антитела;
- в) комплемент; из сыворотки крови) пропердин;
- д) трансферрин и др.;
- е) интерфероны (образующиеся из Т- и В-лимфоцитов);
- ж) вируснейтрализующие ингибиторы.

Интерфероны направленно прекращают процесс трансляции вирусной мРНК и синтеза вирусного белка, за счет индуцирования ими другого клеточного белка. Регулярное образование интерферона происходит в местах репродукции возбудителя при естественном заражении и при вакцинации, например, при введении осповакцины – на коже, вакцины против вируса гриппа – в легких, вакцины против вирусов энцефалита – в мозгу. Затем образовавшийся интерферон всасывается в кровь и распределяется по всему организму.

Специфический фактор защиты – это выработка на распознанные антигены специфических антител и сенсibilизированных (лат. sensibilis – чувствительный) лимфоцитов. Продуцентами иммуноглобулинов (антител) являются Т-лимфоциты (дифференцируются под влиянием тимуса, то есть от лат. Glandus thymus – зобная, или вилочковая, железа) и В-лимфоциты (образуются под влиянием фабрициевой сумки (бурсы) у птиц или ее неустановленного окончательно аналога у млекопитающих).

Специфичность взаимодействия антител или иммуноглобулиновых рецепторов клетки с антигеном обусловлена их высоким сродством (комплементарностью) к определенным участкам молекулы антигена, так называемым детерминантным участкам или антигенным детерминантам.

При иммунизации одним и тем же антигеном животных (одного или разных видов) в качестве детерминант могут выступать различные участки молекул антигена, так как каждый индивидуум отличается способностью иммунокомпетентных клеток специфически распознавать лишь те или иные антигенные детерминанты. В динамике иммунного ответа могут вырабатываться антитела против все новых и новых детерминантных участков той же молекулы антигена. Эти, вначале скрытые, детерминанты выявляются у антигена в результате его деградации в организме под влиянием клеточных ферментов.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующие задания:

ЗАДАНИЕ 1. Описать подробно количественное определение хорионического гонадотропина методом иммуноферментного анализа и дать предложенному методу теоретическое обоснование.

O'NTUSTIK QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.38 из 72	

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Дайте общее определение иммунитета. Что такое чужеродные агенты?
2. Какие виды иммунитета вы знаете? Какие виды антимикробного иммунитета вы знаете?.
3. В чем заключается механизм иммунного ответа? Что такое фагоцитоз завершённый и фагоцитоз незавершённый?
4. Каковы гуморальные факторы неспецифического общего иммунитета?
5. В чем заключается специфический фактор защиты?
6. Дайте общее определение диагностикумам? Как применяются моноклональные антитела, каковы области их применения?
7. Что такое резистогены и биосенсоры?
8. Какие вакцины вы знаете? Как классифицируются вакцины по технологии их получения?
9. Что такое токсоиды, каковы их особенности?
10. Какие достижения генной инженерии и молекулярной биологии в области медицины, фармации и ветеринарии вы знаете?

Занятие № 9

Тема 9: Антибиотики. Классификация. Технология их получения. Определение антимикробной активности антибиотиков

Цель: Ознакомить студентов с технологией получения антибиотиков и с определением антимикробной активности антибиотиков

Задачи обучения

студент должен знать:

- определение биотехнологии как науки и отрасли народного хозяйства, ее цели и задачи, ее основное содержание;
- преимущества и недостатки биотехнологического производства целевых продуктов с заданными свойствами;
- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации;
- достижения биотехнологии в других областях науки и отраслях народного хозяйства;
- основные направления развития биотехнологии как науки и отрасли.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии.

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы, грибы, простейшие и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.
4. Экология, общие понятия и положения. Проблемы экологии.

б) по теме занятия:

1. Биотехнология как наука, ее определение.
2. Объекты биотехнологии, их особенности. Общая классификация объектов биотехнологии.
3. Развитие промышленного производства антибиотиков биотехнологическим способом. Основные задачи поиска и производства новых антибиотиков.
4. Номенклатура и общая характеристика пенициллинов. Основные продуценты.
5. Номенклатура и общая характеристика цефалоспоринов. Основные продуценты.
6. Номенклатура и характеристика аминогликозидных антибиотиков. Основные продуценты.
7. Номенклатура и общая характеристика тетрациклинов. Основные продуценты.
8. Номенклатура и общая характеристика антибиотиков-макролидов. Основные продуценты.
9. Другие группы антибиотиков. Основные продуценты.
10. Основные способы получения новых антибиотиков.
11. Вред от микроорганизмов и пути его преодоления.
12. Достижения биотехнологии в медицине и фармации.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Промышленное производство антибиотиков занимает особое место в биотехнологии. сегодня производство антибиотиков – одна из наиболее развитых отраслей биотехнологии. Ею вырабатывается около 200 антибиотиков (всего известно более 6000 наименований).

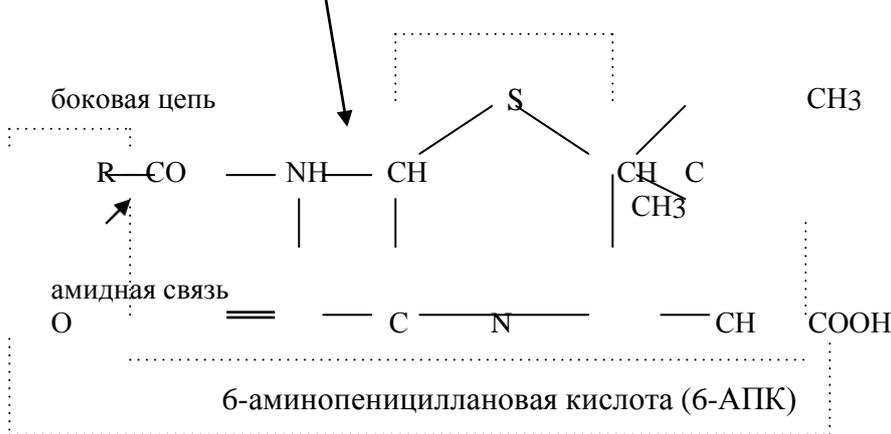
Антибиотики делятся на следующие классы:

1. Пенициллины;
2. Цефалоспорины;
3. Амингликозиды;
4. Тетрациклины;
5. Макролиды.

Пенициллины составляют большое семейство антибиотических веществ, родоначальником которых был пенициллин, образуемый отдельными видами *Penicillium* и впервые полученный в кристаллическом виде Х. Флори и Е. Чейном (1940):

β-лактамное кольцо

тиазолидиновое кольцо



пенициллин

В пеницилинах радикал R– может быть представлен различными структурами. Наиболее известным и широко используемым препаратом был бензилпенициллин (или пенициллин G), в котором в качестве радикала – бензильный остаток, в пенициллине V – феноксиметил и т.д.

Можно считать, что медицинская биотехнология зародилась с началом промышленного производства пенициллина в 40-е годы и использования его в терапии ряда заболеваний.

Применение этого первого антибиотика повлияло на снижение заболеваемости и смертности, но, с другой стороны, поставило ряд новых проблем, а именно:

- во-первых, успешное применение пенициллина вызвало большую потребность в этом лекарственном препарате, и для ее удовлетворения нужно было повысить его выход в промышленных масштабах;
- во-вторых, первый пенициллин G (бензилпенициллин) действовал преимущественно на грам-положительные бактерии (*Streptococcus* и *Staphylococcus*), а нужно было получить антибиотики с более широким спектром действия и/или активностью, поражающие и грам-отрицательные бактерии (*E. Coli*, *Pseudomonas*);
- в-третьих, поскольку антибиотики вызывали аллергические реакции (незначительные, иногда тяжелые в виде анафилаксии), необходимо было иметь целый набор антибактериальных средств, чтобы можно было выбрать не вызывающий у больных аллергию равноэффективный препарат;
- в-четвертых, пенициллин нестабилен в кислой среде желудка;
- в-пятых, многие бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам.

Эти проблемы удается решать с помощью биотехнологии и генной инженерии. Так, увеличить выход пенициллина при его производстве удалось, в основном, благодаря последовательному использованию серии мутантов исходного штамма *Penicillium chrysogenum* (воздействия УФ- и рентгеновского облучения, азотистого иприта, и в результате спонтанного мутагенеза), а также путем изменений условий выращивания.

Были выделены новые антибиотики, эффективные в случае грам-отрицательных бактерий: стрептомицин, синтезируемый нитчатками бактериями (*Actinomycetes*) рода *Streptomyces*, и цефалоспорин, продуцируемый плесневым грибом *Cephalosporium*. Хотя цефалоспорины и относятся к β -лактамам, содержащим β -лактамное ядро, аналогичное таковому у пенициллинов, по своему строению они существенно отличаются от последних, что позволяет назначать их больным, у которых аллергия на пенициллин.

Путем замещения боковой цепи природной β -лактамной молекулы получено множество полусинтетических антибиотиков с новыми свойствами:

- с другим спектром действия;
- с другой чувствительностью к пенициллиназе;
- с другой чувствительностью к содержимому ЖКТ и т.п.

Пенициллины. Вначале бензильную группу пенициллина G удаляли химическим путем с образованием G-аминопенициллановой кислоты, но если в культуральную среду ввести бактерии, образующие амидазы, то это превращение можно осуществить и биологическим путем. Это еще один пример биологической конверсии (см. методические указания занятия № 7). Так, ампициллин является полусинтетическим производным бензилпенициллина, отличающимся от него лишь наличием добавленной аминогруппы в боковой цепи. Тем не менее он активен при пероральном введении и действует на широкий спектр бактерий, в том числе на некоторые грам-отрицательные, вызывающие заболевания органов дыхания (*Haemophilus influenzae*), пищеварения (*Shigella*, *Salmonella*) и выделения (*E. coli*, *Proteus*). Устойчив к кислоте и кловксациллин, и к тому он не разрушается β -лактамазами. Его часто назначают вместе с ампициллином тем больным, у которых обнаружены стафилококки, синтезирующие пенициллиназу, или же при «госпитальных» инфекциях, когда наличие таких ферментов весьма вероятно.

В настоящее время во многих странах (в том числе и в России) созданы биотехнологические процессы с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы для выделения 6-АПК из бензилпенициллина. Пенициллинамидазу образуют многие виды бактерий (палочки, кокки, актиномицеты), грибов (дрожжи, нитчатые), в том числе сами продуценты пенициллина. Полученная 6-АПК затем используется для химического синтеза других препаратов пенициллинового ряда.

Например, созданы кислотоустойчивые препараты фенетациллин, пропициллин, фенбенициллин и др.; пенициллиназа-устойчивый антибиотик метициллин; кислотоустойчивый

препарат широкого спектра действия – ампициллин; кислото- и пенициллиназа-устойчивые препараты ксациллин, нафциллин, клоксациллин и др.

Цефалоспорины – это семейство антибиотиков, близкое по химическому строению к пенициллинам. Применяются, когда у больного есть аллергия к пенициллинам. Цефалоспорины ингибируют развитие и размножение грам-положительных и грамтрицательных бактерий, хотя по активности в отношении чувствительных микробов они уступают пенициллинам.

По аналогии с 6-АПК путем химического синтеза удалось трансформировать 7-АЦК (7-аминоцефалоспоровую кислоту) в иные производные, некоторые из них нашли практическое применение в химиотерапии инфекционных заболеваний так, например, цефалоглицин, цефалотин, цепорин, цефалексин и др.

Родственными пенициллинам и цефалоспорином являются антибиотики – **монобактамы** – моноциклические β-лактамы, у которых структурным ядром выступает β-лактамное кольцо. Монобактамы активны против возбудителей «госпитальных инфекций».

Аминогликозидные антибиотики включают ряд противомикробных веществ, в химической структуре которых имеются гликозидные связи: стрептомицины; канамицины; гентамицины; гигромицин; сизомицин; амикацин и др. Продуцируют их различные виды актиномицетов. Аминогликозиды – антибиотики широкого спектра действия в отношении чувствительных грам-положительных и грам-отрицательных бактерий.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Опишите методику определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар по ГФ РК, т. 2, стр 208.

ЗАДАНИЕ 2. Приготовьте агаровые пластинки для проведения определения анти-микробной активности антибиотиков методом диффузии в агар по ГФ РК.

Состав среды № 1: Мясо-пептонный бульон 100 мл

Агар-агар 2 г

pH среды 7,0-7,2

Стерилизация при 120⁰ С в течение 15 минут в автоклаве или 30 минут при 100⁰ С

Методика приготовления агаровых пластинок описана в методических указаниях к лабораторным занятиям по курсу «Биофармация».

В качестве буферного раствора для растворения антибиотика можно использовать воду для инъекций из ампул или раствор натрия хлорида в ампулах. Разведение следует применять 1:100, 1:200 или 1:300, так, чтобы концентрация раствора стандартного образца антибиотика составляла 1 мг/мл.

В качестве тест микробов в работе можно использовать следующие культуры: *Staphylococcus aureus* 209 P

Candida utilis ЛИА-01

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus cereus var. *mycoides* 537

Bacillus cereus var. *mycoides* НВ

Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134

ЗАДАНИЕ 3. Измерить зоны подавления роста тест-микробов и сделать выводы об антимикробной активности исследуемых антибиотиков.

Зоны подавления роста культур тест-микробов следует измерять миллиметровой линейкой с достаточной точностью (до 0,1 мм) и сравнивать с зоной подавления роста при применении стандартного образца антибиотика.

ЗАДАНИЕ 4. Решить ситуационную задачу:

Для эффективного проведения биотехнологического процесса большое значение имеет питательная среда, в которой микроорганизмы – продуценты БАВ используют в качестве источника азота различные азотсодержащие соединения, содержащие аминный азот или ионы аммония. Какие

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.42 из 72	

условия проведения ферментации по источнику азота при получении антибиотиков будут являться оптимальными?

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Дайте краткую классификацию объектов биотехнологии.
2. Когда началось развитие промышленного производства антибиотиков биотехнологическим способом? Каковы основные задачи поиска и производства новых антибиотиков?
3. Дайте номенклатуру и общую характеристику пенициллинов. Каковы их основные продуценты?
4. Дайте номенклатуру и общую характеристику цефалоспоринов. Каковы их основные продуценты?
5. Дайте номенклатуру и общую характеристику аминогликозидных антибиотиков. Каковы их основные продуценты?
6. Дайте номенклатуру и общую характеристику тетрациклинов. Каковы их основные продуценты?
7. Дайте номенклатуру и общую характеристику антибиотиков-макролидов. Каковы их основные продуценты?
8. Дайте общую характеристику другим группам антибиотиков, их номенклатуру. Каковы их основные продуценты?
9. Каковы основные способы получения новых антибиотиков?

Занятие № 10

Тема 10: Препараты липидов микробного происхождения. Технология получения.

Цель: Ознакомить студентов фармацевтическими препаратами липидов микробного происхождения. Технологией получения

Задачи обучения

студент должен знать:

- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации;

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии.

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы, грибы и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

б) по теме занятия:

1. Биотехнология как наука, ее определение. Объекты биотехнологии, их особенности.
2. Развитие промышленного производства липидов биотехнологическим способом. Основные задачи поиска новых продуцентов для производства липидов.
3. Развитие промышленного производства липидов биотехнологическим способом. Основные

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.43 из 72	

задачи поиска новых продуцентов для производства липидов.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Под общим названием «липиды» объединяют большую группу нейтральных жиров и жироподобных веществ. По химической природе липиды делятся на следующие группы: а) жиры или триглицериды; б) высокомолекулярные жирные кислоты; в) фосфатиды (или фосфолипиды); г) цереброзиды; д) стерины и стериды; е) ганглиозиды; ж) воска и воскоподобные вещества. Жиры – сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот, в состав которых входят многочисленные предельные (насыщенные) и непредельные (ненасыщенные) жирные кислоты. Часть ненасыщенных высших жирных кислот является незаменимыми (эссенциальными) и не синтезируются в организме человека *de novo*: линолевая, линоленовая, гамма- линоленовая, арахидоновая, эйкозапентаеновая и др. Они должны поступать в организм с пищей (около 5 г в сутки). Эти кислоты содержатся, в основном, в растительных маслах. Из-за ряда недостатков, свойственных растениям и водорослям, в качестве продуцентов липидов заслуживают особого внимания микроорганизмы, которым в последние годы отводится центральная роль в биотехнологии.

Наиболее доступными микроорганизмами, способными к синтезу липидов, являются дрожжи и мицелиальные грибы. Они являются безвредными по отношению к человеку, имеют удовлетворительную скорость роста, способны расти на сравнительно простых синтетических средах и образуют липиды с высокой степенью ненасыщенности. Синтезированные ими липиды обладают рядом ценных и уникальных свойств. Так, для мицелиальных грибов характерен синтез липидов, близких по составу жирных кислот, в том числе незаменимых, а также по содержанию отдельных классов липидов (фосфолипидов, цереброзидов) к растительным маслам и липидам некоторых животных тканей. Из них наибольшего внимания заслужили представители *Zygomycetes* и *Ascomycetes* (роды *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*). В Англии для получения микробных липидов широко используются различные штаммы грибов порядка *Mucorales*: *Mucor javanicus* и *Mortierella isabellina* (род *Mucor*). Они синтезируют липиды с выходом 28,5-36,1 % от массы биомассы.

Липиды с высокой степенью ненасыщенности и высоким содержанием незаменимых высших жирных кислот широко применяются в медицине и косметологии. Они обладают противотромбозным, противовоспалительным, сосудорасширяющим, гипотензивным действием, применяются для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркта миокарда, инсультов. Ряд липидных препаратов предложены для профилактики и лечения дерматологических нарушений, атеросклероза, гепатита, цирроза печени и многих других болезней.

В промышленных условиях в настоящее время микробиологическим путем (биотехнологическим способом) получают витамины В₂ (рибофлавин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (цианкобаламин), Д₃ (эргостерин – с помощью облученных дрожжей), Н (биотин), РР (пантотеновая кислота), β-каротин (провитамин А) и др.

В синтезе некоторых витаминов (витаминов С и РР) микроорганизмы используются лишь на некоторых ступенях химического синтеза.

В мире сегодня работает свыше 40 фирм по производству витаминов: 18 – в США, 8 – в Японии, 14 – в Западной Европе, 5 – в странах СНГ, в том числе 2 – в РФ. Ведущее место занимает фирма *Hoffman La Roche* (Швейцария), выпускающая до 50-70 % всех витаминов.

Витамин В₁₂ или цианкобаламин – важное биологическое соединение. Из животного сырья его не выделяют в чистом виде, так как его концентрация очень низкая (в печени быка □ 1 мг/кг), а химический синтез очень сложен, включает 70 ступеней. Поэтому в промышленности его получают биосинтетическим путем. Ежегодно выпускается 3,5-4,0 тонн витамина В₁₂, 2 тонны гидроксикобаламина и 1,0-1,5 тонны – коэнзима В₁₂ и некоторое количество метилкобаламина (в указанных количествах они используются в медицине). Остальное (свыше указанного) количество применяется в животноводстве

Витамин В12 синтезируют многие бактерии. Дрожжи и мицелиальные грибы не образуют корриноиды, поэтому не синтезируют витамин В12. В настоящее время в промышленности используются 3 штамма бактерий *Pseudomonas denitrificans* (выход 59-60 мг/л), штаммы трех представителей *Propionibacterium* (выход 23-40 мг/л, но есть патентное сообщение из Франции о достижении этими штаммами невероятно высокого выхода – 216 мг/л) и штаммы метаногенных бактерий – смешанную культуру (выход 35-36 мг/л). Во всех случаях независимо от используемого штамма и условий культивирования в среду вводят ионы кобальта и часто 5,6 ДМБ. Добавление таких предшественников корриноидов, как глицин, треонин, δ -АЛК и аминокпропанол, может оказывать стимулирующее действие на витаминообразование.

В последние годы путем мутаций и селекции штаммов примерно на 50 % увеличена продуктивность по витамину В12 у *Pseudomonas denitrificans*. Используется также технология рекомбинантных ДНК. Так, в *E. coli* клонированы гены *Propionibacterium technicum*, ответственные за синтез витамина В12.

Рибофлавин – витамин В2 или лактофлавин уникален тем, что образуется *de novo* в очень больших количествах и за короткое время некоторыми микроорганизмами (бактерии, грибы, дрожжи). Эти микроорганизмы, включаемые в группу аскомицетов (*Eremothecium ashbyii* и *Asbya gossypii*), синтезируют более 3 и 7 г/л рибофлавина соответственно. В связи с открытием Гильермоном в 1935 г. такой биосинтетической способности у микроорганизмов в микробиологической промышленности появился термин «сверхсинтез», а штаммы названы «суперпродуцентами».

Но, несмотря на столь высокие выходы рибофлавина, существует жесткая конкуренция между микробиологическим процессом и химическим синтезом.

Микроорганизмы служат также источником коферментной формы рибофлавина – FAD, имеющей очень важное значение в фармации.

Рибофлавин синтезируется большей частью высших растений, а высшие животные не способны к самостоятельному его синтезу. Их потребность в витамине В2 удовлетворяется пищей и микрофлорой ЖКТ.

В соответствии с классификацией А. Демайна микроорганизмы-продуценты витамина В2 делятся на 3 подгруппы:

а) слабые сверхпродуценты. К ним относятся виды *Clostridium*. Так, *Clostridium acetobutylicum* был первым организмом, о котором в 1933 году появилось сообщение как о хорошем продуценте рибофлавина. Синтез витамина В2 клостридиями чувствителен к ионам F^{+2} . При контроле этого факта получали примерно 100 мг/л рибофлавина;

б) умеренные сверхпродуценты. К ним относятся дрожжи, особенно вида *Candida* и *Pichia*, а именно *P. Guilliermondii* и *C. flaveri*, но их чувствительность к иону F^{+2} в сотни раз выше, чем у клостридий; поскольку для их культивирования применяют сложные среды, требуется тщательная очистка их от ионов F^{+2} , что затрудняет применение дрожжей в промышленности. В лабораторных условиях с помощью *C. flaveri* за 7 дней получают примерно 600 мг/л рибофлавина;

в) сильные суперпродуценты. К ним относятся дрожжеподобные грибы *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. Они представляют собой патогены растений и инфицируют хлопчатник. Ионы F^{+2} не оказывают на их синтез рибофлавина, что служит важным преимуществом для использования в промышленности.

Промышленное производство рибофлавина осуществляется тремя способами:

- полным химическим синтезом;
- полным микробиологическим синтезом (получают 30 % витамина В2 от общего количества);
- смешанным синтезом, включающим микробный синтез рибозы с последующей химической трансформацией ее в рибофлавин.

Последним способом получают до 70 % рибофлавина, так как рибозу проще и экономичнее получать путем микробной ферментации. С этой целью в Японии используют высокопродуктивные штаммы – мутанты *Vac. subtilis* и другие бациллы, образующие около 70 г/л

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.45 из 72	

рибозы. В СНГ, в том числе в РФ используется созданный в СССР методами генетической инженерии штамм *Bac. subtilis*, для которого оптимизирована питательная среда. Он образует в промышленности 4 г/л рибофлавина за 35 часов.

Его кофермент FAD получают также микробным синтезом из внесенных в среду предшественников (FMN и аденина). К активным продуцентам FAD относятся *Eremothecium ashbyii*, *Sarcina lutea*, *Brevibacterium ammoniagenes*. Выход FAD у достигается за 5 дней ферментации.

Витамин С – L-аскорбиновая кислота впервые была выделена из лимонов. В 1933 году группы Рейхштейна и Гавордта независимо друг от друга сообщили о химическом синтезе L-аскорбиновой кислоты. По методу Рейхштейна витамин С получают в настоящее время в промышленности. Одну реакцию многоступенчатого синтеза, а именно высокоселективное дегидрогенирование D-сорбита в L-сорбозу в соответствии с этим методом осуществляют с помощью уксуснокислых бактерий. Ежегодно производят более 35 тысяч тонн L-аскорбиновой кислоты. Процесс экономичен: из 2 кг глюкозы получают 1 кг аскорбиновой кислоты. Для превращения D-сорбита в L-сорбозу чаще всего используют *Acetobacter xylinum* и *Acetobacter suboxydans*. Этот этап проводят в аэрируемых ферментерах с перемешиванием. Среда содержит сорбит, источник азота (кукурузный экстракт) и мел, pH среды 5,0-6,0, $t = 30-35^{\circ} \text{C}$. Если воздух заменить на кислород при повышенном давлении, то время ферментации сокращается. Ферментация заканчивается за 24 часа. После фильтрования или центрифугирования клеток прозрачную жидкость деионизируют, концентрируют и получают кристаллы L-аскорбиновой кислоты. Выход L- сорбозы около 87 %.

Предложен также ряд методов получения витамина С с помощью других микроорганизмов, которые осуществляют биоконверсию на других ступенях синтеза.

Витамин Д₂ получают путем выделения провитамина Д – эргостерина из пекарских дрожжей с последующим облучением эргостерина.

β-каротин – провитамин А получают в основном из растений и микроорганизмов. Его микробиологическое производство имеется в странах СНГ, Франции, США, Польше и др. Провитамин А – превращается в витамин А в мукозных мембранах тонких кишок человека и хранится в печени в виде эфира пальмитата. β-каротин и родственные каротиноиды образуют, главным образом, микроскопические грибы и водоросли, а ксантофиллы – бактерии и грибы. К продуцентам каротиноидов относятся фототрофные бактерии семейства *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae*, *Chlorobiaceae*, *Chloroflexus*. Самый высокий выход β-каротина дают грибы *Blakeslea trispora*. Это гетероталлический гриб, образующий (+) и (-) мицелий. β-каротин образует (-)- штамм. При добавлении триспоровых кислот к (-)-штамму выход β-каротина сильно увеличивается. Процесс ведется глубинным культивированием. Выход составляет 1,2 г/л β-каротина. Оптимизацией процесса и состава питательной среды удалось достигнуть выхода β-каротина до 1430 мг/л, то есть 1,43 г/л.

Витамины группы В служат коферментами многих ферментов, катализирующих биохимические реакции. Ряд заболеваний вызывается отсутствием или дефицитом в организме того или иного витамина.

В последние годы разрабатываются новые методы лечения заболеваний, не вызываемых инфекцией, но связанных с нарушением обмена веществ, причиной которого может служить неправильная работа ферментов. В частности, возможно использование ингибиторов ферментов, участвующих в возникновении и развитии соответствующего заболевания.

К настоящему времени открыто уже большое количество ингибиторов ферментов микробного происхождения, которые нашли применение в медицине.

Ингибиторы протеаз. Их известно много:

а) Бестатин образуют *Streptomyces olivoretuculi*. Является ингибитором аминопептидазы В и лейцинаминопептидазы. Иммуномодулятор, он увеличивает гиперчувствительность *in vivo*, усиливает активность антираковых препаратов у животных и человека, увеличивает число клеток, образующих антитела, и задерживает рост медленно растущей твердой опухоли (лимфосаркомы Гарднера и УМС-карциномы).

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.46 из 72	

б) для лечения эмфиземы легких рекомендован микробный ингибитор протеаз – α -антитрипсин. Наследственное отсутствие α -антитрипсина приводит уже в раннем возрасте к тяжелой форме указанного заболевания, так как отсутствие ингибитора эластазы вызывает локальный распад коллагена в тканях легких. Ген человеческого α -антитрипсина ввели *E. coli*, которая вырабатывает его в количестве 15 % от всех клеточных белков (10 мг/л). Препарат проявляет антиэластазную активность и назван «Энглин».

Ингибиторы кишечных гликозидаз:

а) Акарбоза – ингибитор β -глюкозидазы. Образуется *Actinoplanes sp.*.

б) Ингибитор амилазы выделен из *Streptomyces tendae*. Они блокируют гидролиз крахмала и снижают содержание сахара в крови. Акарбоза применяется при диабете.

Ингибиторы орнитиндекарбоксилазы. Полиамины: путресцин, спермин и спермидин – играют неясную, но важную роль для роста, размножения и дифференциации клеток. Орнитин декарбоксилаза (сам фермент) контролирует скорость синтеза полиамина в клетках млекопитающих. Из *Streptomyces neogawaensis* выделили два вещества: дигидроксисаркомицин и саркомицин (старый противоопухолевый препарат), ингибиторы орнитиндекарбоксилазы, которая является хорошей мишенью при таких заболеваниях, как псориаз, хронические простатиты и рак.

Ингибитор пролил-4-гидроксилазы. Аккумуляция фибротической ткани вызывает фибротические заболевания соединительной ткани. Фиброз легких и печени у животных и человека предотвращается пролиновыми аналогами. Нетоксичного ингибитора синтеза коллагена не было известно, поэтому большой интерес вызвал ингибитор P-1894B, выделенный из *Streptomyces sp.* и оказавшийся идентичным по действию противоопухолевому антибиотику винкомицину А. при оральном введении вещество нетоксично. Мишенью ингибитора является пролил-4-гидроксилаза, способствующая секреции коллагена.

Ингибиторы ферментной системы, изменяющей давление крови. Кровяное давление обычно регулируется ренин-ангиотензионной системой. Ангиотензиноген (плазматический белок) расщепляется под действием трипсина и ренина с образованием инертного пептида ангиотензина I (АI). Под действием АI-изменяющего фермента (Zn-экзопептидазы) из АI образуется ангиотензин II (АII). Сверхпродукция АII – главная причина высокого кровяного давления. Синтезированы лекарственные препараты: каптоприл и его производные, действующие как ингибиторы вышеуказанного фермента. Каптоприл – производное небольшого пептида, оно выделено из культуральной жидкости *Streptomyces sp.*

Таким образом, как сказал Луи Пастер «Последнее слово будет за бактериями», промышленная микробиология или биотехнологический синтез включает эксплуатацию микроорганизмов в промышленных масштабах для получения коммерчески ценных продуктов, в том числе лекарственных препаратов. Благодаря рентабельности, биотехнологическое производство целевых продуктов, особенно в фармацевтической отрасли ежегодно расширяется. Параллельно с этим постоянно ведутся поиски новых штаммов и новых, ценных для практики продуктов, образуемых микроорганизмами.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Составить технологическую схему получения фосфолипидных препаратов для лечения лекарственных осложнений. Теоретически обосновать каждую операцию и состав питательной среды.

ЗАДАНИЕ 2. Составить аппаратную схему получения фосфолипидных препаратов для лечения лекарственных осложнений биотехнологическим способом. Теоретически обосновать выбор каждого аппарата и установки.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.47 из 72	

1. Дайте определение биотехнологии как науки. Что является объектом биотехнологии?
2. Как началось развитие промышленного производства липидов биотехнологическим способом? Каковы основные задачи поиска новых продуцентов для производства липидов? Какие липиды являются ценными для человека?
3. Как началось развитие промышленного производства витаминов биотехнологическим способом? Каковы задачи поиска новых продуцентов для производства витаминов?
4. Дайте номенклатуру и общую характеристику витаминов, получаемых биотехнологическим способом.
5. Дайте характеристику основным продуцентам витамина В12.
6. Дайте характеристику основным продуцентам витамина В2. На какие группы они делятся? Что понимают под «сверхсинтезом»?
7. Дайте характеристику основным продуцентам витамина С. В чем заключаются особенности производства аскорбиновой кислоты?
8. Дайте характеристику основным продуцентам витамина Д2. Каковы особенности производства β-каротина?

Занятие № 11

Тема 11: Биотехнологические методы получения стероидных гормонов. Микроорганизмы-трансформаторы.

Цель: Ознакомить студентов с биотехнологическими методами получения стероидных гормонов.

Задачи обучения:

студент должен знать:

- объекты биотехнологии и методы биотехнологии;
- различные виды биоконверсии, области применения, используемые микроорганизмы;
- номенклатуру стероидных гормонов, получаемых химическим путем, из природного сырья биотехнологическим способом;
- получение гормональных препаратов (инсулина, проинсулина, соматотропина) с применением технологии рекомбинантных ДНК;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации;
- основные направления развития биотехнологии как науки и отрасли.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
 - проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Основные группы микробиологических объектов: бактерии, вирусы и др.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

б) по теме занятия:

1. Развитие промышленного производства стероидных гормонов биотехнологическим способом. Основные задачи поиска и производства новых микроорганизмов - преобразователей стероидных гормонов.
2. Номенклатура и общая характеристика стероидных гормонов, получаемых в результате биоконверсии. Основные микроорганизмы, участвующие в биоконверсии.
3. Производство гормональных препаратов (инсулина, гормона роста человека) с использованием технологии рекомбинантных ДНК.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.48 из 72	

4. Вред от микроорганизмов и пути его преодоления.
5. Достижения биотехнологии в медицине и фармации.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Известно, что биосинтез лекарственных препаратов является более экономичным, эффективным, щадящим для окружающей среды, не требует катализаторов, высоких температур и давления и т.д. В то же время препараты гормонов и других веществ, получаемые биосинтезом, идентичны человеческим, в отличие от полученных из животного сырья.

Биотехнологическим способом, благодаря достижения в области генной инженерии (генетической перестройке «in vitro» и «in vivo», технологии рекомбинантных ДНК) стало возможным получать такие препараты как инсулин, интерфероны, соматотропин (гормон роста человека)

Различные виды биоконверсии. Микроорганизмы используются также и отдельных стадиях синтеза лекарственных веществ, который ранее осуществлялся путем многоступенчатых и дорогостоящих химических реакций. Так, один из штаммов хлебной плесени, *Rhizopus arrhizus*, на начальном этапе синтеза производного стероида – кортизона, может гидроксировать прогестерон по 11-му положению. Применение подобной стратегии биоконверсии наряду с традиционными химическими превращениями позволило получать многие стероиды более простыми и дешевыми способами на основе стероидосодержащего растительного сырья. Именно благодаря

этому, такие стероиды, как преднизон, преднизолон, дексаметазон, тестостерон, эстрадиол и т.д. сегодня широко применяются в клинике.

Получение преднизолона из гидрокортизона, гидрокортизона из кортексолона, преднизона из ацетата кортизона, из сорбозы сорбита – вот неполный перечень процессов, осуществляемых в настоящее время в промышленных масштабах методом микробиологической трансформации. Так, для гидроксирования стероидов используются микроскопические грибы, для восстановления стероидов – микроорганизмы рода *Mycobacterium* и т.д.

Получение стероидных гормонов с использованием технологии рекомбинантных ДНК.

К гормонам липоидной природы (стероидные гормоны) относятся кортикостероиды, андрогены-эстрогены, простагландины. Так, в промышленности выпускаются стероидные гормональные препараты, получаемые полусинтетическим путем: этинил-эстрадиол, синэстрол, диэтилстильбэстрол, метилтестостерон и др.

Инсулин, выделенный из поджелудочной железы свиней и коров, отличаются по аминокислотному составу от инсулина человека: у коровы – по 3 аминокислотам, у свиней – по 1. Это обуславливает побочные эффекты при применении

Применяя технологию рекомбинантных ДНК в производстве инсулина:

- на I этапе воссоздают аминокислотную последовательность ДНК инсулина человека, раздельно синтезируя гены его А- и В-цепей;
- на II этапе каждый из генов встраивают в ген β-галактозидазы плазмид;
- на III этапе плазмиды вводят в клетки *E.coli*.

Поскольку бактерии растут на среде с галактозой, а не с глюкозой, то в них индуцируется синтез β-галактозидазы, и вместе с ней А- и В-цепей инсулина. После выделения и очистки синтезированный таким образом инсулин не содержит белков *E.coli*, эндотоксинов и пирогенных веществ, не отличается от человеческого инсулина и проявляет полную биологическую активность.

Аналогично с помощью *E.coli* получают проинсулин, который после расщепления трипсином и β-карбокислэпептидазой переходит в нативный инсулин.

Бактерии *Vacillus* в отличие от *E.coli* способны экскретировать проинсулин в культуральную жидкость. Выделенный в среду белок обычно проще очищать, чем внутриклеточный. Помимо этого, использование штаммов *Vacillus* имеет то преимущество, что они не образуют эндотоксинов.

Интерфероны – это группа белков, открытых в ходе изучения веществ, вырабатываемых клетками, зараженными вирусами. Они индуцируют как локальные, так и системные антивирусные

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.49 из 72	

реакции в других клетках. Кроме того, интерфероны обладают еще двумя важными свойствами: а) подавляют пролиферацию клеток (являются потенциально противоопухолевым средством); б) модулируют иммунную систему. Классифицируют интерфероны на группы

- α-интерфероны (лейкоцитарные);
- β-интерфероны (интерфероны фибробластов);
- γ-интерфероны (иммунные или Т-лимфоцитарные).

Ранее интерфероны получали из лейкоцитов крови человека, поэтому были дороги и малодоступны из-за небольшого получаемого количества. Сейчас интерфероны получают, включая его ген в плазмиды, затем клонируя их в клетки *E. coli* (α- и γ-интерфероны) или дрожжевые клетки (β-интерфероны).

Гормон роста человека – это белок, который образуется и секретируется в кровь передней долей гипофиза. Он необходим для роста костей. Его недостаток приводит к карликовости. До недавнего времени его получали только из трупного материала, что имеет свои ограничения.

Благодаря технологии рекомбинантных ДНК с использованием клеток *E. coli* стало возможным наладить его производство в достаточном количестве. Очищенный препарат гормона из бактерий по биологической активности подобен гормону из гипофиза

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Опишите технологию выделения и очистки стероидных гормонов из культуральной жидкости. Дайте характеристику применяемым аппаратам.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Когда началось развитие промышленного производства стероидных гормонов биотехнологическим способом?
2. Каковы основные задачи поиска новых микроорганизмов-преобразователей стероидных гормонов?
3. Какова номенклатура и общая характеристика стероидных гормонов, получаемых в результате биоконверсии?
4. Какие микроорганизмы участвуют в биоконверсии стероидных гормонов?
5. В чем заключаются особенности производства гормональных препаратов (инсулина, гормона роста человека) с использованием технологии рекомбинантных ДНК?
6. Персонал. Помещения и оборудование.
7. Исходные и упаковочные материалы.
8. Документация.
9. Хранение продукции, исходных и упаковочных материалов.

Занятие №12

Тема 12: Получение каллусной ткани лекарственных растений

Цель: Ознакомить студентов с получением каллусной ткани лекарственных растений

Задачи обучения

студент должен знать:

- определение биотехнологии как науки и отрасли народного хозяйства
- объекты культуры ткани;
- основы теории тотипотентности;
- методы культивирования тканей лекарственных растений, понятие о каллусе;

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.50 из 72	

- понятие о ризосекреции;
- правила выбора исходных растений для выделения культуры ткани;
- достижения генетической инженерии в применении к культуре ткани растений. Метод слияния протопластов
- номенклатуру препаратов, получаемых из культуры ткани растений.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани с научными открытиями в других отраслях науки;
- ставить задачи, решаемые именно в биотехнологии и культуре ткани.

Основные вопросы темы

а) по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Основные группы микробиологических объектов.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

б) по теме занятия:

1. Культура ткани как отрасль биотехнологии. Краткая историческая справка.
2. Преимущества и недостатки культуры ткани лекарственных растений в биотехнологическом производстве целевых продуктов с заданными свойствами.
3. Объекты культуры ткани, их особенности.
4. Основы теории тотипотентности.
5. Методы культивирования тканей лекарственных растений, понятие о каллусе.
6. Понятие о ризосекреции.
7. Правила выбора исходных растений для выделения культуры ткани.
8. Достижения генетической инженерии в применении к культуре ткани растений. Метод слияния протопластов.
9. Номенклатура растений, используемых для получения целевых продуктов из культуры клеток и ткани.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Известно, что биосинтез лекарственных препаратов является более экономичным, эффективным, щадящим для окружающей среды, не требует катализаторов, высоких температур и давления и т.д. Для получения некоторых лекарственных препаратов необходимы растения, которые трудно поддаются или практически не поддаются культивированию, в то же время сбор дикорастущего сырья затруднен различными факторами. Поэтому в последние годы все шире используются культуры клеток и культуры тканей растений. Это позволяет отказаться: - от культивирования самих лекарственных растений; от сбора их в условиях естественного произрастания. Первые попытки выращивания в искусственных условиях мельчайших кусочков растительных тканей были осуществлены Reehinger (1893 г.), который укоренял в сыром песке фрагменты растительных органов размером не более 20 мм и изолированных почек ряда видов растений. Опыты не дали положительных результатов. Несколько позднее задачу культуры ткани растений поставил перед собой Haberlandt (1902 г.), занявшись выращиванием «in vitro» клеток палисадной паренхимы, сердцевин, железистых волосков и других элементов растительных тканей. Haberlandt не мог достичь в условиях примитивной лабораторной техники своего времени значительных успехов. Его заслуга заключалась в предвидении значимости метода культуры ткани для биологических исследований в будущем. Позже в этой области больших успехов достигли такие ученые, как Бутенко (1964-1968 гг.), Уайт, Слепая, Волоссович и др.

Большое значение для решения практической задачи использования культуры ткани высших растений для промышленных целей в фармацевтике имеет вопрос о способности дедифференцированных клеток воссоздавать в условиях искусственной культуры биохимические

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.51 из 72	

процессы, приводящие в целом растении к синтезу органических веществ вторичного происхождения.

Творцы клеточной теории организмов – Schleiden (1838) и Schwann (1839) – первыми высказали мысль о потенциальной одинаковости клеток, то есть сформулировали понятие тотипотентности. Эта гипотеза была поддержана Virchow (1858).

Согласно понятию тотипотентности – все клетки являются потенциально и генетически одинаковыми, способными к автономному существованию, и обладают возможностями производить все сложные биохимические процессы, присущие целому растению. При этом клетки в культуре тканей лекарственных растений, очевидно, будут способны синтезировать алкалоиды, гликозиды и другие биологически активные вещества.

Многие современные исследователи решительно отстаивают мнение о тотипотентности растительных клеток. Однако следует иметь в виду, что каллусные ткани, полученные от любого органа растения, способны накапливать заданные биологически активные вещества (БАВ), но степень обогащения тканей и питательной среды этими соединениями различна. Было установлено, что происхождение культуры ткани (листья, корни, плоды) влияет как на качественный состав вырабатываемых БАВ, так и на их количество, поэтому не каждый орган растения является удобным для получения от него промышленной культуры ткани ценных лекарственных растений. Речь идет о некоторой ограниченности в тотипотентности клеток. Эта черта ха- рактерна для клеток тканей растений. По-видимому, у некоторых из них она выражается сильнее, чем у других. Например, тотипотентность в отношении выработки алкалоидов более выражена у скополии гималайской, чем у дурмана индийского. Поэтому, имея дело с видом растения, клетки разных органов которого обладают разной способностью к биосинтезу БАВ, ученынаучились подбирать ткани, более продуктивные по целевым ценным веществам.

Поэтому чаще всего объектом культуры ткани является – культура ткани корней, корневищ и клубней лекарственных растений, так как именно в них чаще всего происходит максимальное накопление целевых продуктов.

Культура тканей лекарственных растений – сравнительно молодая отрасль науки биотехнологии. Как известно, в природных условиях клетки растений находятся в тканях и органах и защищены от механического воздействия окружающей среды. Кроме того, эти клетки нуждаются во множестве компонентов минеральной и органической природы для метаболизма и ро ста, поэтому эксперименты культивирования этих клеток «in vitro» в прошлом завершались неудачами. Лишь в 1922 г. Роббинсу удалось на синтетической питательной среде осуществить рост меристемы кончиков корней томатов и кукурузы. Впервые культуру тканей лекарственно-го вида, а именно барвинка розового (*Vinca rosea*) получил в 1945 году Уайт (Whit, 1945) от корончатого галла. Несколько позднее в опытах Telle и Gauthereta (1947) получена культура ткани черной белены и доказана ее способность вырабатывать соответствующие алкалоиды. В дальнейшем изучение метода культуры тканей лекарственных растений шло возрастающими темпами. Начало практического культивирования тканевых культур растений можно отнести к 1955 году. В конце 50-х годов XX века был предложен метод массового выращивания клеток и тканей растений погруженным (глубинным) способом в ферментерах. С 1965 г. началось выращивание лекарственных растений в СССР. В настоящее время в промышленных масштабах

нарабатывается культура тканей корней женьшеня, раувольфии змеиной, душистого табака и др.

Метод культуры ткани имеет следующие преимущества:

1. Сбор биомассы можно производить через короткие промежутки времени, в природе же лишь один раз в год при ежегодной вегетации, если растение однолетнее, либо на 3-4 год (корень белладонны, скополии и др.), либо через 10-15 лет (корень женьшеня, раувольфии змеиной и др.).

2. Доступность метода – выращивание растительных тканей и клеток возможно в любых климатических условиях, так как процесс осуществляется либо в закрытых помещениях, либо в закрытых аппаратах.

3. Стоимость культуры ткани невелика, так как клетки растений культивируются на сравни-

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.52 из 72	

тельно простых средах.

Методы культивирования культуры ткани (культуры клеток) растений:

1. Выращивание на агаризованных средах (агар-агар), имеющих консистенцию студня. При этом образуется скопление дедифференцированных клеток, называемых каллусом (callus, лат – мозоль). Процесс осуществляется в закрытых помещениях (гидропонные плантации). При получении каллуса культуры ткани подобраны следующие технологические параметры: температура $+25-27^0$ С, рН среды 5,3; темнота, плотность среды, соответствующая 0,8- 1,0 % охлажденному раствору агара, добавленного в питательную среду и др. Обычно эксплантат обрабатывают дезинфицирующими растворами и промывают очищенной водой. Затем его помещают в раствор, содержащий ферменты (целлюлоза, гемицеллюлоза и пекти- наза), разрушающие клеточные стенки, при этом образуются тысячи одиночных «голых» клеток – протопластов, не имеющих клеточных стенок. В питательном растворе протопласты образуют новые клеточные стенки, клетки начинают делиться. Период прединкубации длится в течение 3-6 суток. Через 4-6 недель культивирования трансплантата возникает первичный каллус, который необходимо перенести на свежую питательную среду. При культивировании на агаризованных средах (твердофазный способ культивирования) кусок каллуса должен иметь массу 60-100 г на 30-40 мл свежей среды. Каллусная ткань, выросшая на поверхности твердой питательной среды, имеет аморфную структуру, представляющую собой массу тонкостенных паренхимных клеток. Процесс получения культуры ткани твердофазным способом требует использования большой площади, не гарантирует стерильности и дает низкий выход продукта.

2. Культивирование в жидкой среде – клетки при размножении образуют суспензии. Для глубинного культивирования необходимо получить линии клеток, образующих небольшие агрегаты (по 5-10 клеток). Более пригодны рыхлые каллусные ткани. Трансплантат желательно обрабатывать пектиназой. Рекомендуются использовать среды, содержащие 2,4- дихлорфеноксиуксусную кислоту и не содержащие ионы Ca^+ . В таких средах агрегаты клеток не образуются (получается тонкая суспензия). Перед пересевом первичную культуру фильтруют через двойной слой марли или через сита (нейлоновые, металлические), чтобы отделить крупные агрегаты каллусной ткани и остатки трансплантата. На образование кле точных агрегатов также оказывает влияние интенсивность перемешивания среды, так как клетки чрезвычайно чувствительны и быстро лизируются. Большинство клеток погибает. Первоначальное глубинное культивирование можно осуществлять в колбах на качалках при частоте вращения 100-120 об./мин. На 60-100 мл среды используют 2-3 г свежей каллусной ткани. Для промышленного культивирования растительных клеток используют специальные металлические или стеклянные ферментаторы различной конструкции (с мешалками или барботажного типа). Режим ферментации периодический или непрерывный, главным образом хемостатный. Биосинтез проводят в аппарате объемом от 0,1 до 63 м³ и более. Аэрацию культуральной биомассы осуществляют стерильным воздухом через барботер. В ходе культивирования клеток растений регулируют температуру ($+25-37^0$ С), рН среды и окислительно-восстановительный потенциал. При этом на накопление суспензии клеток влияет состав среды (необходимы специальные питательные добавки к среде, так как растительного срока недостаточно), продолжительность культивирования, температура, скорость перемешивания, кратность аэрации. Процесс культивирования ведут до тех пор, пока идет интенсивный синтез целевого продукта и в среде не будут исчерпаны питательные вещества.

Каждый из методов культивирования характеризуется, как показано выше, отличительными признаками.

Необходимо отметить, что растительные клетки растут и размножаются значительно медленнее, чем клетки микроорганизмов. Время их удвоения – 1-3 суток. Процесс культивирования растительных клеток занимает 2-3 недели, что повышает требования к обеспечению асептических условий.

В составе среды большое значение имеют природа и количество витаминов и микроэлементов. Так, для растительных клеток имеют большое значение соли азота, калия, магния, фосфора и ряда микроэлементов. Из органических веществ, помимо углеводов, важны отдельные аминокислоты, витамины и фитогормоны (индолилуксусная кислота, кинетин), ауксины,

цитокинины (гиббереллиновая кислота) и др. Иногда в среду добавляют растительные гормоны роста в качестве биокатализаторов или ингибиторы роста, так излишнее накопление биомассы уменьшает синтез целевых продуктов.

В качестве примера приведен состав среды в мг/л для культивирования клеток воробейника (таблица 1).

Метод культивирования изолированных тканей, клеток и протопластов растений достиг сегодня высокого уровня, применяется для решения ряда биологических и ботанических проблем, в том числе проблемы борьбы с вирусными заболеваниями растений и т.п.

Таблица 1. Состав среды в мг/л для культивирования клеток воробейника

Компоненты	Концентрация	Компоненты	Концентрация
KNO ₃	80	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
Ca(NO ₃) ₂	300	MoO ₃	0,001
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5
KCl	65	Na ₂ SO ₄	200
MgH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	21	Сахароза	20 000
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	200	Глицин	3
MnSO ₄	5	Тиамин гидрохлорид	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	Пиридоксин гидрохлорид	0,1
H ₃ BO ₃	1,5	Никотиновая кислота	0,5
KI	0,75	Индол-3-уксусная кислота	1,75
		Кинетин	2,15

Перспективным является также использование метода культуры ткани для получения биологическим путем в лабораторных условиях растительных веществ вторичного происхождения. Практический интерес представляют алкалоиды, гликозиды, полисахариды, терпеноиды, эфирные масла, ферменты, пигменты и др. Некоторые вторичные метаболиты, получаемые при культивировании растительных клеток, перечислены в таблице 2.

Продукт	Применение
Винбластин или винкристин Дигитин Хинин	Лечение лейкемии Лечение сердечно-сосудистых заболеваний Лечение малярии
Кодеин Аймалин	Аналептик Противоаритмическое

Для фармации особенно перспективно получение лекарственных веществ растительного происхождения методом культуры ткани, так как в интактных растениях они образуются в небольших количествах, и культивирование самих растений нерентабельно.

В настоящее время широко применяется метод культуры ткани лекарственных растений в следующих случаях:

- 1) если природные ресурсы лекарственного растения оскудевают (истощаются);
- 2) если вегетация (произрастание) растения очень длительна: 3-4 года и более.
- 3) когда переработка больших количеств сырья (например, всего растения) нерентабельна;
- 4) когда данное лекарственное растение для региона, где расположен перерабатывающий завод, является экзотом (ekzot – чужой), а перевозка заготовленного исходного сырья для переработки нерентабельна, в то же время культивирование их вне зоны естественного произрастания представляет значительные трудности или не удается совсем. Примером служат женьшень, раувольфия змеиная и др.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.54 из 72	

Большое практическое значение имеет сравнение химического состава культуры ткани с исходным растением, от которого она получены. Так, для культуры ткани, полученной от проросшей пыльцы гинкго (*Ginkgo biloba*), установлено большое химическое сходство с исходным растением.

Понятие о ризосекреции. Обращает на себя внимание способность культуры клеток и ткани выделять в окружающую среду органические соединения (минеральные соли, спирты, углеводы, аминокислоты, ферменты, фенольные соединения и др.), то есть осуществлять секреторную функцию. Выделительная система высших растений представлена в основном корнями, поэтому из таких растений изолируют культуру клеток или тканей корней, клубней, корневищ. Так, например, культура тканей корней дурмана выделяет в питательную среду алкалоиды тропанового строения. Из корневых каллусов белладонны в питательную среду выделяются алкалоид атропин, ферменты (фосфатаза, амилаза, пероксидаза) выделяется культурой тканей табака, полифенольные соединения – каллусными тканями диоскореи, суммы аминокислот (до 79 %)

%) – тканями табака (21 % белка накапливается в биомассе).

Процесс секреции веществ культурой ткани корней, названный ризосекрецией (*Rhizoma* - корень), позволяет значительно снизить стоимость получаемых лекарственных препаратов. Основные преимущества такого производства: простота, дешевизна, безопасность получения препаратов, доступность и др.

Последние достижения генной инженерии привели к получению культуры ткани растений, корни которых секретируют не только алкалоиды, гликозиды, но и биотехнологические белки (ферменты, аминокислоты). Эти белки могут быть использованы для лечения различных заболеваний человека.

Ученые, занимающиеся культурой ткани растений, считают, что трансгенные растения являются лучшим источником получения человеческих белков, чем трансгенные животные, которые могут секретировать биотехнологические белки вместе с молоком, так как растения не содержат патогенные для человека вирусов и бактерий, часто встречающихся в молоке или моче трансгенных животных.

Глубинное культивирование культуры клеток растений. Усовершенствование техники культивирования клеток в суспензии и разработка методов получения и культивирования изолированных протопластов позволили применить к соматическим клеткам растений логику и принципы работы с микроорганизмами.

Один из новых подходов – клеточная инженерия или селекция на клеточном уровне, позволяет получать гибридные клетки. При этом гибридные клетки продуцируют не только метаболиты исходных растений, но и совершенно иные вещества. Гибридизацию растительных протопластов успешно осуществляют методом электростимуляции слияния клеток или прямым микроинъектированием ДНК одной клетки в другую. Ямомото получил таким образом гибридные клетки из *Sorbus japonica* и *Euphorbia millii*, которые активно продуцировали алкалоид берберин – антибактериальное и противотифозное вещество. Концентрация берберина в культуральной жидкости достигает 1,39 г/. При этом популяция соматических клеток или протопластов растений рассматривается как суспензия индивидуальных организмов, каждый из которых способен дать целое растение. Наилучшим источником для клонирования, то есть высева клеток, индукции их деления и получения колоний от индивидуальных клеток, являются изолированные протопласты. Они представляют собой генетически и физиологически выровненную популяцию с высокой репродуктивной способностью. Протопласты растений довольно быстро и эффективно регенерируют клеточную стенку, у них легко индуцировать деление с образованием каллусной ткани. Из каллуса можно вырастить растения, способные цвести и давать всхожие семена. Доступность жизнеспособных протопластов позволила генетикам растений проводить опыты по мутагенезу и селекции на уровне единичной клетки и получать растения и культуры тканей, устойчивые к болезням, химическим веществам, токсинам и др.

Однако из-за объективных трудностей на практике используется для клонирования - суспензия клеток. Суспензия клеток в отличие от суспензии протопластов представляет собой систему, характеризующуюся цитологической, физиологической и генетической гетерогенностью.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»	
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.55 из 72	

Последнее свойство создает определенные преимущества при клонировании, так как длительно культивируемая суспензия обогащается спонтанными мутациями. С другой стороны, цитологическая гетерогенность снижает количество одиночных клеток, способных к образованию клонов. В результате чего мутантный клон может быть утерян.

Сегодня разработан ряд методов культивирования отдельных клеток, например:

1. Отбор одиночных клеток с последующим выращиванием их в микрокамерах или микрокаплях.

2. Массовый рассев клеток с определенной плотностью. При высокой плотности посева может произойти слияние возникших колоний, а при низкой плотности приходится использовать дополнительные приемы (применение тканей-нянек, питающего слоя, обогащенных сред, естественного или искусственного кондиционирования).

Использование этих методов повышает эффективность образование колоний в 10-20 раз. Для растительных клеток особо значение имеют стрессовые воздействия (мутагены), позволяющие получать такие культуры клеток и тканей, которые синтезируют, накапливают в биомассе или секретируют в питательную среду целевые продукты с заданными свойствами с достаточным выходом.

В настоящее время получено более 30 видов различных изолированных клеточных культур лекарственных растений, продуцирующих БАВ либо на уровне интактного растения, либо в большом количестве.

Первый российский биопродукт из культуры изолированных клеток – настойка «Биоженьшень» - разработан в лаборатории культуры ткани Институт физиологии растений РАН под руководством Р.Г. Бутенко. Препарат получен на основе высокопродуктивного клеточного штамма культуры клеток женьшеня и используется для приготовления лосьонов, кремов, тонизирующих напитков. Комплекс гинзенозидов (сапонинов женьшеня), выделенный из культуры тканей, обладает противоэпилептическим действием.

Методами клеточной селекции с использованием химических мутагенов и оптимизации условий выращивания получен высокопродуктивный штамм клеток раувольфии змеиной, накапливающий противоритмический алкалоид аймалин (до 50 % от суммы синтезируемых алкалоидов).

Суспензионная клеточная культура василисника малого продуцирует берберин - растительный антибиотик и противоопухолевое средство, при этом более 80 % синтезируемых тканями алкалоидов секретируются в культуральную жидкость.

Берберин синтезирует также культура клеток барбариса. В Японии налажено биотехнологическое производство берберина из культуры клеток коптиса японского, а также производство нафтохинонового пигмента шиконина – природного антибиотика широкого спектра действия из культуры ткани Воробейника. На основе шиконина в России разработана мазь «Эритромин», обладающая широкой антимикробной, антибактериальной и противогрибковой активностью.

Культура тканей тиса обыкновенного в перспективе является источником противоопухолевого препарата – таксола. Так, для лечения одного больного в течение года требуется 120-130 г сухой коры нативного растения, поэтому сырьевые ресурсы его истощаются.

Активно продолжаются работы с культурой клеток барвинка розового, продуцирующего противораковые алкалоиды (Винкристина, стоимость субстанции которого достигает 30 тыс. долл. за 1 кг, и Винбластин – около 20 тыс. долл. за 1 кг).

В Германии разработали способ получения кислоты розмариновой из культуры клеток каллуса розмарина. Кислота розмариновая – вещество с противоопухолевой активностью и природный антибиотик широкого спектра действия.

Из культуры клеток табака получен убихинон 10. на основе убихинона получают препарат для лечения инсультов и курирования спаечных процессов.

Таким образом, благодаря многочисленным работам в области культуры тканей растений биотехнология достигла больших успехов. Это позволяет получать пищевые продукты (каллусная ткань сои, корня моркови, клубней картофеля и др. – трансгенные растения), фармакологические

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.56 из 72	

препараты (культура тканей корней белладонны, скополии, дурмана, душистого табака и др.). Но работы в этом направлении продолжаются.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

После фронтального опроса или индивидуального собеседования по контрольным вопросам студенты должны выполнить следующее задание:

ЗАДАНИЕ 1. Составить примерный перечень компонентов жидкой и полутвердой питательных сред для выращивания культуры ткани корня дурмана и теоретически обосновать его. Ввести в эти питательные среды предшественники роста (дать список), либо ингибиторы роста (дать список). Дать им теоретическое обоснование.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Что собой представляет культура ткани как отрасль биотехнологии? Дайте краткую историческую справку.
2. Каковы преимущества и недостатки культуры ткани лекарственных растений в биотехнологическом производстве целевых продуктов с заданными свойствами?
3. Что является объектами культуры ткани растений? Каковы их особенности?
4. В чем заключается теория тотипотентности? Кто заложил основы этой теории?
5. Каковы методы культивирования тканей лекарственных растений? Что такое каллус?
6. Что понимают под ризосекрецией? Как это явление используется в биотехнологии?
7. Каковы правила выбора исходных растений для выделения культуры ткани?
8. Каковы достижения генетической инженерии в применении к культуре ткани растений? В чем заключается метод слияния протопластов?
9. Какова номенклатура растений, используемых для получения целевых продуктов из культуры клеток и ткани?

Занятие №13

Тема 13: Бактериофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Фармацевтические препараты на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов

Цель: Ознакомить студентов фармацевтическими препаратами на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов.

Задачи обучения

студент должен знать:

- методы биотехнологии;
- особенности твердофазного культивирования;
- особенности и преимущества глубинного культивирования;

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии и культуры ткани с научными открытиями в других отраслях науки.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Микробиология. Основные группы микробиологических объектов.
3. Физиологические подходы к культивированию микробиологических объектов.

по теме занятия:

1. Общие представления о нормальной микрофлоре и ее функциях.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.57 из 72	

2. Разделение на группы индигенных (постоянные) и транзиторных (случайные), микроорганизмов.
3. Состав нормальной микрофлоры человека.
4. Краткая характеристика отдельных представителей нормофлоры. Облигатная микрофлора. Бифидобактерии. Функции нормальной микрофлоры кишечника.
5. Бактерийные препараты, обладающие селективной антагонистической активностью.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии, организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших, а также 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. В организме человека проживает 10^{14} - 10^{16} бактерий, т.е. бактериальных клеток значительно больше, чем клеток самого организма. Они составляют своеобразный «экстракорпоральный» (хорошо организованный) орган. Этот «орган», как и любой орган человека, имеет свои функции, критерии, показатели функционального состояния, т.е. нормы и отклонения от нее.

Велика защитная роль нормофлоры в обеспечении здоровья, поэтому нарушение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера. Дисбиотические состояния приводят к изменениям количественного и качественного состава нормофлоры человека.

Микроорганизмы индигенные (постоянные) и транзиторные (случайные), с которыми человек встречается в течение жизни, можно условно разделить на 4 группы:

1. микроорганизмы, не способные к длительному пребыванию в организме человека, нахождение которых в нем носит случайный характер;
2. постоянные представители микрофлоры, приносящие несомненную пользу (бифидо-, лакто- и колибактерии);
3. условно-патогенные представители нормофлоры, которые при определенных условиях могут стать патогенными (стафилококки);
4. микроорганизмы - возбудители инфекционных заболеваний.

Рассматривая микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) даже практически здорового человека, нельзя говорить об абсолютной норме.

Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной резистентности организма. Одним из главных механизмов защиты от колонизации условно-патогенными и патогенными бактериями является присутствие в организме достаточного количества собственной полезной микрофлоры, к которой, в первую очередь, относятся **лакто- и бифидобактерии**. Молочнокислые бактерии (*Lactobacteria*) относятся к грампозитивным истинным бактериям, имеющим округлую форму (*Streptococcus*, *Diplococcus*) или палочковидную (*Lactobacterium*) форму. Молочнокислые кокки и многие бактерии располагаются в виде коротких или длинных цепочек. Те и другие не образуют пор, неподвижны, анаэробны.

Молочнокислые бактерии в кишечнике человека занимают одно из ведущих мест по своей численности среди других представителей бактериальной флоры. Бесспорно, что эти микроорганизмы играют первостепенную роль в симбиотических взаимоотношениях нормальной микрофлоры кишечника с макроорганизмом.

В процессе сбраживания сахара одни молочнокислые бактерии образуют в качестве главного продукта молочную кислоту. Поэтому их называют *гомоферментными (одноферментными)*, другие - *гетеро-ферментными*, продуцирующими в качестве основных продуктов молочную и уксусную кислоты, этанол, двуокись углерода и некоторые летучие вещества типа эфиров. Гомоферментативные бактерии включают *S. lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacterium casei*, *L. lactis* и др. К гетеро-ферментным относят ароматообразующие бактерии, а также представителей бактерий из групп *Betabacterium*, *Coli*: - *aerogenes* и некоторые другие.

Имеются молочнокислые бактерии, развивающиеся при оптимальной температуре 25-35 °С (мезофилы), *S.lactis*, ароматообразующие бактерии; при 40-45 °С (термофилы) – *L. lactis*, *L. helveticum*.

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в *формировании и функционировании иммунной системы*. В экспериментах на животных установлено, что пероральное введение бифидо- и лактобактерии повышает устойчивость к различным инфекциям, что дает возможность говорить об иммунопотенцирующей способности эубиотиков. Иммуностимулирующий эффект под воздействием нормофлоры проявляется усилением фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов, синтезом цитокинов, стимуляцией клеточных иммунных механизмов защиты.

Нормальная микрофлора *способствует пролиферации плазматических клеток*. Бифидобактерии стимулируют синтез антител, лактобактерии повышают активность фагоцитов и лимфоцитов. Бактериальные модулины бифидо- и лактобактерии стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, интерферона, увеличивают уровень пропердина и комплемента, повышают активность лизоцима, способствуют уменьшению проницаемости сосудисто-тканевых барьеров для токсичных продуктов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, препятствуют транслокации бактерий во внутренние органы и кровь, уменьшают воспалительные процессы слизистой кишечника.

Анаэробные бактерии *вырабатывают БАВ*, как ρ -аланин, 5-амино-валериановая и гамма-аминомасляная кислоты, а также медиаторы, влияющие на функцию ЖКТ, печени, сердечно-сосудистой системы, кроветворение и обменные процессы. Продукты жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника (в том числе пропеонозные бактерии) оказывают регулирующее действие на вегетативную нервную систему. Как «естественный биосорбент» нормальная микрофлора способна аккумулировать значительное количество различных токсических продуктов, включая металлы, фенолы, яды растительного и микробного происхождения, другие ксенобиотики. Деятельность нормальной микрофлоры кишечника делает организм менее зависимым от окружающей среды.

Положительными функциями нормальной микрофлоры кишечника являются:

1. Колонизационная резистентность;
2. Синтетическая функция - способность бактерий продуцировать витамины, гормоны, антибиотики;
3. Поддержание высокого уровня содержания лизоцима, секреторных иммуномодулинов, интерферона, важных для иммунологической резистентности;
4. Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов;
5. Обменная функция - участие бактерий в метаболизме белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, солей, желчных кислот и других жизненно важных веществ;
6. Пищеварительная - морфокинетическое влияние на слизистые оболочки, абсорбцию абиотических компонентов, транзит нутриентов, газовый состав, мышечный тонус кишечника, перистальтику кишечника, эвакуацию кишечного содержимого.

При определенных условиях микрофлора человека может оказать неблагоприятное влияние на жизнедеятельность и состояние организма человека. Возможно возникновение гнойно-воспалительных реакций, сенсibilизации организма со многими клиническими проявлениями аллергического порядка, формирование в организме банка плазмид и генов с проявлениями мутагенной и антимутагенной активности.

Нормофлоры в борьбе с дисбактериозом. Бифидобактерии, молочнокислые бактерии, непатогенные штаммы кишечной палочки, образующей бактериоцины на основе нормофлор. Получение готовых форм нормофлор.

Велика защитная роль нормофлоры в обеспечении здоровья, поэтому нарушение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера. Дисбиотические состояния приводят к изменениям количественного и качественного состава нормофлоры человека.

Микроорганизмы эндогенные (постоянные) и транзиторные (случайные), с которыми человек встречается в течение жизни, можно условно разделить на 4 группы:

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.59 из 72	

5. микроорганизмы, не способные к длительному пребыванию в организме человека, нахождение которых в нем носит случайный характер;
6. постоянные представители микрофлоры, приносящие несомненную пользу (бифидо-, лакто- и колибактерии);
7. условно-патогенные представители нормофлоры, которые при определенных условиях могут стать патогенными (стафилококки);
8. микроорганизмы - возбудители инфекционных заболеваний.

Рассматривая микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) даже практически здорового человека, нельзя говорить об абсолютной норме.

Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной ре-зистентности организма. Одним из главных механизмов защиты от колонизации условно-патогенными и патогенными бактериями является присутствие в организме достаточного количества собственной полезной микрофлоры, к которой, в первую очередь, относятся **лакта- и бифидобактерии**. Молочнокислые бактерии (Lactobacteria) относятся к грампозитивным истинным бактериям, имеющим округлую форму (Streptococcus, Diplococcus) или палочковидную (Lactocobacterium) форму. Молочнокислые кокки и многие бактерии располагаются в виде коротких или длинных цепочек. Те и другие не образуют пор, неподвижны, анаэробны.

Молочнокислые бактерии в кишечнике человека занимают одно из ведущих мест по своей численности среди других представителей бактериальной флоры. Бесспорно, что эти микроорганизмы играют первостепенную роль в симбиотических взаимоотношениях нормальной микрофлоры кишечника с макроорганизмом.

Нормальная микрофлора кишечника выполняет и регулирует многие функции организма, которые можно уподобить работе лаборатории, осуществляющей многие сотни биохимических процессов. Биомасса микробов, заселяющих кишечник взрослого человека, составляет 2,5-3 кг. В процессе их жизнедеятельности образуются органические кислоты, снижающие pH среды толстой кишки до 5,3-5,8, лизоцим и другие антибиотикоподобные вещества, обуславливающие антагонистическую активность этих бактерий по отношению к патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоре. Представители нормофлоры в кишечнике конкурируют с патогенной флорой за аргинин, аспарагиновую кислоту, серии, за область обитания - экологические ниши. Таким образом, бифидо- и лактобактерии регулируют количественный и качественный состав нормальной микрофлоры кишечника, *сдерживая рост и размножение в нем патогенных и условно-патогенных микробов*.

Микроорганизмы, составляющие нормофлору, представляют собой четкую морфологическую структуру в виде биопленки. Толщина ее 0,1 - 0,5мм. В ней содержится от нескольких сотен до нескольких тысяч микроколоний, образующихся как из анаэробных, так и аэробных бактерий.

Формирование биопленки создает для бактерий дополнительную защиту. Внутри биопленки бактерии более устойчивы к действию химических и физических факторов, влияющих на состояние нормальной микрофлоры. К ним относятся:

- 1)эндогенные:
 - а)секреторная функция организма;
 - б)гормональный фон;
 - в)кислотно-основное состояние;
- 2)экзогенные: условия жизни (климатические, бытовые, экологические).

Любые количественные или качественные изменения типичной для данного биотопа нормофлоры человека, возникающие в результате воздействия на макро- или микроорганизм различных неблагоприятных факторов приводят в дисбактериозу.

Для коррекции дисбактериоза необходимо устранить причину, вызвавшую его, затем использовать эубиотики(пробиотики) и пребиотики и симбиотики.

Пребиотики - это препараты немикробного происхождения, способные оказывать позитивный эффект на организм хозяина через селективную стимуляцию роста или метаболической активности нормальной микрофлоры кишечника, стимулирующие рост и размножение так называемых дружественных человеку бактерий. Это низкомолекулярные углеводы (фруктозо-олисахариды,

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.60 из 72	

инулин, лактулоза и др.), которые не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами.

Основные известные препараты:

- лактулоза - синтетический дисахарид. Микрофлора толстой кишки гидролизует лактулозу до молочной (в основном) и частично до муравьиной и уксусной кислот. Она способствует понижению рН содержимого толстого кишечника, снижению концентрации гнилостных бактерий, стимулирует перистальтику кишечника и усиливает рост бифидо- и лактобактерий;

- кальция пантотенат участвует в процессах ацетилирования и окисления в клетках, углеводном и жировом обменах, синтезе ацетилхолина, стимулирует образование кортикостероидов в коре надпочечников;

- лизоцим способствует нормализации нарушений микрофлоры. наиболее активен в отношении грамположительных патогенных и условнопатогенных бактерий. Лизоцим обладает бифидогенным, иммуномоделирующим, противовоспалительным действием, улучшает пищеварение, стимулирует метаболические процессы и эритропоэз, проявляет синергизм со многими антибиотиками.

Симбиотики - комплексные препараты, содержащие пробиотик и пребиотик.

Пробиотики - это препараты нормальной микрофлоры человека. пробиотики имеют в своем составе живые клетки специально подобранных штаммов микроорганизмов растительного или животного происхождения; они выживают в условиях кишечного окружения, непатогенны, нетоксичны, стабильны в течение длительного срока хранения.

Механизм положительного влияния пробиотиков включает:

- подавление микробных патогенов за счет продукции антибактериальных веществ, конкуренции за лимитируемые питательные вещества и сайты адгезии на кишечной стенке;

- влияние на ферментативную активность кишечных микроорганизмов;

- стимуляцию иммунной системы макроорганизма.

В России производят в основном моновалентные препараты: бифидумбактерин (на основе *Bifidobacterium bifidum*), апилак (на основе *Lactobacillus acidophilus*), колибактерин (на основе кишечной палочки *E. Coli M-17*), лактобактерин (на основе *Lactobacillus plantarum, fermentum*). комплексные препараты, например бификол (*Bifidobacterium* и *E. Coli M -17*). За рубежом производя поливалентные (комплексные) препараты: симбиофтор, бификор, примадофилюс (содержит комплекс микроорганизмов симбионтов) и другие.

Они предназначены в основном для профилактики и лечения дисбактериоза. Особенно широко применяют в клинике детских болезней (при острой дизентерии, сальмонеллезе, эшерехиозе, вирусных диареях, диатезе и др.). При несформировавшейся микробиологической системы ЖКТ у детей применение препаратов пробиотиков оказывается очень эффективным.

Препараты пробиотиков также применяют в комплексном лечении кишечных инфекций, энтероколитах на фоне нарушения микрофлоры с дефицитом или полным отсутствием бифидофлоры и др.).

Пробиотики также назначают ослабленным людям после соматических заболеваний и по завершении лечения антибиотиками, лицам преклонного возраста, так как у них в связи с изменением гормонального статуса уменьшается количество бифидо- и лактобактерий.

Действующим началом лактосодержащих препаратов являются живые лактобациллы, обладающие антагонистическим действием против широкого спектра патогенных и условнопатогенных бактерий за счет продукции кислот, перекиси водорода, лизоцима и антибиотических веществ. локтобациллы выделяют ферменты, витамины, способствуют пищеварению, улучшают обмен веществ, обладают иммуномоделирующим действием, нормализуют естественную резистентность организма. Лактосодержащие препараты целесообразно назначать детям и взрослым при лечении ОКИ, хронических заболеваниях ЖКТ с выраженными дисбиотическими явлениями, особенно в случае дефицита лактофлоры или при использовании этих препаратов в комбинированной терапии с антибиотиками.

К лактосодержащим препаратам относится лактобактерин, апилакт, аципол, линекс, гастрофарм, биобактон.

Среди колисодержащих препаратов следует отметить колибактерин, лечебное действие которого обусловлено антагонистической активностью кишечной палочки в отношении патогенных и

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.61 из 72	

условнопатогенных микроорганизмов, включая шингеллы, сальмонеллы, протей и др., бифидол и бифилор.

Препараты из апатогенных представителей других таксономических групп или микробных метаболитов. В этой группе относятся препараты из апатогенных представителей родов *Bacillus*, *Aerococcus* и *Saccharomyces*. Из спорообразующих бацилл готовят препараты бактисубтил, споробактерин, бактиспорин и биоспорин. Лечебное свойство споровых препаратов обусловлено их выраженными антагонистическими свойствами против широкого спектра патогенных и условнопатогенных бактерий, в том числе протеев, стафилококков и грибов рода *Candida*. Эти препараты содержат комплекс ферментов, стимулирующих пищеварение, способствуют лучшему усвоению пищи, содержат протеолитические и фибринолитические ферменты, чем способствуют очищению воспалительных очагов от некротических тканей. Наиболее известный представитель этой группы - это препарат Хилак-форте. Он содержит концентрат продуктов метаболизма бактерий тонкой и толстой кишки, в том числе метаболиты *Lactobacillus acidophilus*, *L.helveticus*, *E-coli*, *Enterococcus faecalis*, молочную и фосфорную кислоты, аминокислоты и другие вещества, способствующие нормализации рН, восстановлению водно-электролитного баланса, состава нормофлоры и поддержанию физиологической функции слизистой оболочки кишечника.

Технология получения пробиотиков

Необходимым условием массового производства препаратов пробиотиков является сохранение их стабильности в течение длительного времени. Бактерийные препараты, содержащие живые организмы, относятся к наименее стойким. На выживаемость микроорганизмов в сухих препаратах влияют следующие факторы:

- регламентированное содержание остаточной влаги;
- наличие защитных сред;
- хранение сухих препаратов в атмосфере, не содержащей кислород.

В целях защиты пробиотиков от кислой среды желудка на таблетированные и капсулированные формы наносят ацидорезистентные покрытия или проводят иммобилизацию бактерий на сорбенте.

Для получения препаратов пробиотиков необходимо иметь штаммы микроорганизма симбионта. Их выделяют из кишечного содержимого здоровых детей и взрослых. Эти штаммы должны обладать следующими свойствами:

- наличие полезного воздействия на организм хозяина, подтвержденным лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями;
- штаммы должны быть идентифицированы с учетом генетических признаков так как для получения пробиотиков разрешены штаммы только определенных видов микроорганизмов;
- при длительном использовании они не должны вызывать побочных эффектов. Штаммы не должны быть непатогенными и нетоксичными;
- наличие колонизационного потенциала, то есть сохранение в пищеварительном тракте до достижения максимального положительного действия (должны быть устойчивы к низким значениям рН, желчным кислотам, антимикробной субстанциям, продуцируемым индогенной микрофлорой с адгезией к эпителию соответствующих слизистых оболочек);
- наличие выраженной антагонистической активности по отношению к патогенным и условнопатогенным микроорганизмам;
- наличие стабильных характеристик как в клиническом, так и в технологическом плане;
- наличие высокой скорости роста и размножения в условиях, близких к таковым в кишечном тракте;
- штаммы молочнокислых палочек должны продуцировать преимущественно L(+) - изомер молочной кислоты;
- при введении в больших количествах они должны обладать минимальной способностью к транслокации из просвета пищеварительного тракта во внутреннюю среду макроорганизма;
- наличие четкой физиолого-биохимической и генетической маркировки как для исключения фальсификации, так и для периодического контроля идентичности свойств исходных и производственных культур.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.62 из 72	

Удовлетворяющие всем этим требованиям штаммы поступают в контрольный институт, откуда их передают в фармацевтическое производство с соответствующими документами, отражающими их характеристики.

В заводских лабораториях штаммы высеивают на искусственные питательные среды, проверяют их соответствие паспортным данным (род, вид, биологические свойства). После этого их используют для получения препаратов пробиотиков. В условиях промышленного производства эти штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые затем пересеивают на агаризированные или жидкие питательные среды (например, молочнокислые бактерии хорошо растут в обезжиренном молоке).

Бифидобактерии, лактобациллы, энтерококки - это аутокотрофы. Они не могут сами синтезировать аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, поэтому их должна содержать питательная среда, в которой они выращиваются. Для культивирования этих бактерий используется сырье, разрешенное в пищевой промышленности, так как препарат, выращенный на этих средах, используется для внутреннего применения.

Источником аминокислот обычно служит белок молока (казеин), который гидролизуют с помощью ферментов (трипсина и пепсина) и получают, соответственно триптол или пептол. Как источник витаминов, а также пиримидиновых и пуриновых оснований используют дрожжевой экстракт, который получают из дрожжей *Saccharomyces* (пивных либо пекарских). В качестве микроэлементов используют соли магния, марганца, цинка, которые добавляют в питательную среду для культивирования молочнокислых бактерий. Источником энергии служит лактоза или глюкоза.

Молочнокислые бактерии культивируют от 8 до 16 часов, собирают штаммы в той фазе роста, при которой выживание клеток будет наиболее длительным. Это обеспечит длительное хранение полученного препарата.

После процесса культивирования получают бактериальную суспензию, содержащую в 1 мл 10⁹ и более клеток. Эти клетки собирают, используя поточные центрифуги или сепараторы, в которой образуется похожая на сметану с кремовым оттенком масса со специфическим запахом кислого молока. Раствор криопротекторов (вещества белковой природы - обезжиренное молоко или желатин, углеводы - лактоза, сахароза) добавляют в проточную массу и получают густую суспензию клеток, которую разливают в ампулы.

Затем их замораживают в жидком азоте и подвергают лиофильной сушке. Сухая масса приобретает пузырчатый вид. Ее измельчают и определяют титр, в соответствии с которым вносят во флаконы или смешивают с культурой другого штамма.

Для увеличения сроков жизнеспособности бактерий показана сублимационная сушка, проходящая в условиях низкой температуры (-40⁰С) и глубокого вакуума.

Укупорку сухих биопрепаратов в виду их гигроскопичности производят под вакуумом или в токе инертного газа.

Форма выпуска - флаконы (бифидумбактерин), или ампулы (бификол), или капсулы («Нутролин В»), или пакетики (бифидумбактерин фирмы «Партнер»).

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Лактобактерин в ампулах. Для производства лактобактерина применяют штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum*, который относится к роду *Actobacilloccus*. Лактобактерий представляют собой грамположительные палочки длиной 0,7-3,0 мкм. Растут в атмосфере CO₂, N₂, O₂. Лактобактерин сухой (*Lactobacterium siccum*) получают по общей схеме для бактериальных препаратов.

Написать технологию производства бактериальных препаратов по следующим стадиям:

1. Приготовление и стерилизация питательных сред;
2. Получение маточной культуры;
3. Выращивание производственной культуры;
4. Розлив лактобактерина в ампулы;
5. Лиофильная (сублимационная) сушка;
6. Запайка ампул;
7. Контроль качества. Описать показатели контроля качества.

ЗАДАНИЕ 2. Запишите ход подготовки питательной среды и посева культуры «чайный гриб».

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.63 из 72	

ЗАДАНИЕ 3. Решить ситуационную задачу:

В условиях фармацевтического производства. Каким образом процесс сушки может оказать влияние на качество препаратов нормофлоры? Обоснуйте возможные методы сушки при получении данной группы препаратов.

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Общие представления о нормальной микрофлоре и ее функциях.
2. Разделение на группы индигенных (постоянные) и транзиторных (случайные), микроорганизмов.
3. Состав нормальной микрофлоры человека.
4. Краткая характеристика отдельных представителей нормофлоры.
5. Obligatная микрофлора. Бифидобактерии.
6. Механизмы, определяющие антагонистическую активность нормофлоры.
7. Факторы, приводящие к развитию дисбактериоза.
8. Требования к промышленным штаммам.
9. Современные средства коррекции микробиоценоза. Классификация и характеристика бактериальных препаратов.
10. Краткая характеристика пробиотиков. Краткая характеристика пребиотиков. Препараты пребиотиков. Краткая характеристика синбиотиков.
11. Бактерийные препараты, обладающие селективной антагонистической активностью. Продукты питания с пробиотиками. Преимущества сухих и жидких пробиотиков.
12. Производство препаратов нормофлоры. Общая схема технологического процесса производства пробиотиков.

Занятие № 14

Тема 14: Производство биотехнологических лекарственных средств в соответствии с требованиями GMP.

Цель: Ознакомить студентов с требованиями GMP на производстве биотехнологических лекарственных средств.

Задачи обучения:

студент должен знать:

- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации.

студент должен уметь:

- пользоваться научной, методической и справочной литературой в области биотехнологии;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии, генной инженерии с научными открытиями в других отраслях науки.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме занятия.
2. Технология лекарственных форм. Применяемые приборы, принципы работ.
3. Технология готовых лекарственных форм: таблеток, инъекционных растворов и лиофильных порошков в ампулах и флаконах и др.

по теме занятия:

1. Особенности GMP для биотехнологического производства.
2. Принципы производства биотехнологических лекарственных средств.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.64 из 72	

3. Стадии биотехнологического производства: создание главного и рабочего банков клеток, поддержание рабочего банка клеток, культивирование клеток и/или ферментация, сбор, выделение и очистка продукции.

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Одним из основных руководящих документов на предприятии является Основное досье производственной площадки (Site Master File), в котором описана организация производства и контроля качества лекарственных средств в соответствии с требованиями Правил надлежащей производственной практики. Документ утверждается руководителем предприятия, согласовывается с высшим руководством, должен иметь уникальный код в системе документации, номер версии, дату утверждения, дату вступления в силу, дату пересмотра и регулярно актуализироваться. Рекомендации по составлению Основного досье производственной площадки подробно описаны в главе I части III Правил надлежащей производственной практики Евразийского Экономического Союза утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77. ФСК распространяется на все этапы жизненного цикла лекарственного препарата и основывается на концепции качества ISO, включает соответствующие положения GMP, дополняет документы ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» и ICH Q9 «Управление рисками для качества» включая управление работами, выполняемыми по контракту (аутсорсинг). Производитель должен разработать Руководство по качеству (далее Руководство) – документ, содержащий описание основных положений ФСК, а также сведений о предприятии и его деятельности в области качества. В Руководстве регламентируют распределение обязанностей, полномочий и ответственности персонала предприятия в системе качества, а также ответственность руководства в рамках ФСК. Руководство включает или ссылается на документально оформленные процедуры системы качества, предназначенные для общего планирования и управления процессами, которые Руководство точно передает политику в области качества, цели и руководящие документированные процедуры организации работ на предприятии. **Система управления изменениями.**

Производитель должен разработать процедуру по управлению изменениями, а также формализованную систему контроля изменений для оценки всех изменений, которые могут повлиять на производство и контроль промежуточной продукции и активной фармацевтической субстанции (далее – АФС). Следует предусмотреть письменные процедуры для идентификации, документального оформления, соответствующей проверки и утверждения изменений в отношении исходного сырья, спецификаций, аналитических методик, помещений, вспомогательных систем, оборудования (включая компьютерное оборудование), стадий технологического процесса, материалов для маркировки и упаковки, а также компьютерного программного обеспечения. До внедрения любые изменения, касающиеся соблюдения требований Правил, должны быть составлены, проверены и утверждены соответствующими подразделениями производителя, а затем проверены и утверждены отделом (отделами) качества с датами утверждения. Определена значимость и масштаб изменения, чтобы определить требует ли это изменение уведомления уполномоченных органов, и согласования с ними. Для оценки предлагаемых изменений необходимо использовать систему управления рисками для качества. Процедура классификации изменений используется при определении объема испытаний, валидации и документации, требуемых для обоснования изменений, вносимых в ранее валидированный процесс. Изменения могут быть классифицированы (например, как существенные или несущественные) в зависимости от их характера и объема, а также влияния, которое они могут оказать на процесс. С учетом обоснованного заключения следует определить, какие дополнительные испытания и исследования по валидации необходимы для обоснования таких изменений. При внедрении утвержденных изменений следует принять меры по пересмотру всех документов, на содержание которых влияют эти изменения. После внедрения изменения в производство следует проводить оценку первых серий, произведенных или испытанных после внедрения этого изменения. Оценить возможность воздействия критических изменений на стабильность и на установленные даты повторных испытаний или даты истечения срока годности.

Отклонения и несоответствия должны быть классифицированы. Необходимо разработать и утвердить заполняемые формы, в которых будут регистрироваться все этапы расследования,

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.65 из 72	

назначить ответственных лиц за проведение расследования, выявить причину, провести анализ и возможные последствия отклонений или несоответствий, принять решение о мерах по устранению. Необходимо оценивать воздействие отклонений и несоответствий. Обратит внимание на такое отклонение как выход за пределы спецификации (OOS). По завершению такого расследования необходимо оценивать все результаты, определить качество серии продукта.

Система корректирующих и предупреждающих действий

Производитель должен разработать процедуру, утвердить формы, которые будут использоваться для регистрации выполняемых действий. Назначить ответственных лиц и сроки выполнения. Критерием результативности корректирующих действий является отсутствие повторного появления несоответствия. Критерием результативности предупреждающих действий является отсутствие фактического появления потенциального несоответствия.

Обзоры качества продукции

Производитель должен разработать процедуру, определить периодичность и сроки составления обзоров качества всех произведенных лекарственных препаратов, в том числе лекарственных препаратов, изготавливаемых на экспорт. Назначить ответственных лиц за проведение и составление таких обзоров. Обзоры качества должны содержать следующее:

1) обзор исходного сырья и упаковочных материалов, используемых при производстве, особенно тех, которые получены от новых поставщиков, и отдельный обзор прослеживаемости цепи поставок фармацевтических субстанций;

2) обзор критических точек контроля в процессе производства и результатов контроля готовой продукции (соответствуют ли результаты промежуточного контроля и контроля готовой продукции установленным показателям качества);

3) обзор всех серий, которые не соответствовали установленным спецификациям, и результатов соответствующих расследований (указывать все несоответствующие спецификациям серии, а также первопричину несоответствия, если она выявлена; в заключении описать устраняемые или не подлежащие устранению причины; в выводах делать оценку расследований и предпринятых корректирующих действий);

4) обзор всех существенных отклонений или несоответствий, обзор связанных с ними расследований, эффективности и результативности, предпринятых корректирующих и предупреждающих действий (указывать все отклонения или несоответствия во время производства серии с указанием причин несоответствия, какое расследование было проведено, насколько эффективными были предпринятые меры);

5) обзор всех изменений, внесенных в процессы или аналитические методики (указывать все изменения, которые были внесены в производственный процесс или аналитическую методику и в заключении оценить воздействие этих изменений на качество продукта);

6) обзор поданных, утвержденных или отклоненных изменений в регистрационное досье, а также обзор изменений в досье на лекарственные препараты, предназначенные только для экспорта (указывать изменения, сделанные в спецификации продукта с указанием их статуса одобрения, в обзоре необходимо отображать официальное решение регуляторного органа; указывать количество лекарственных препаратов, поданные в регуляторный орган, но не получившие одобрения);

7) обзор результатов программы мониторинга стабильности и неблагоприятных тенденций (указывать номера серий, заложенных для изучения стабильности за отчетный период, указывать причину их включения; если при изучении стабильности имелись какие-либо отклонения, выходы показателей качества за пределы спецификации или наблюдаются неблагоприятные тенденции описывать их в заключении с соответствующими выводами, обобщить результаты по исследованию стабильности);

8) обзор всех связанных с качеством продукции возвратов, претензий и отзывов, а также проведенных в это время расследований (указывать серии продукта, по которым были возвраты, причину возврата; указывать серии продукта, по которым были претензии (жалобы, рекламации), причину претензии (жалобы, рекламации), описывать предпринятые меры; указывать серии, которые были отозваны с рынка, причину отзыва, оценивать эффективность осуществлённых отзывов, в выводах оценивать все действия, предпринятые при расследовании рекламаций и действия, направленные на предотвращение их повторений);

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.66 из 72	

9) обзор достаточности любых ранее проведенных корректирующих действий в отношении производства или оборудования (указывать все проведенные корректирующие действия в отношении производства или оборудования, статус выполнения каждого корректирующего действия, делать выводы насколько эти действия были эффективны для устранения конкретной проблемы);

10) обзор пострегистрационных обязательств при получении новых регистрационных удостоверений или внесении изменений в регистрационное досье (указывать все изменения, внесенные в регистрационное досье, статус их выполнения согласно заявлению; если получено новое регистрационное удостоверение, указывать статус исполнения данных обязательств);

11) состояние квалификации соответствующих оборудования и технических средств, например, системы нагрева, вентиляции и кондиционирования воздуха, систем снабжения водой, сжатыми газами (указывать всё оборудование, технические средства, которые используются в производственном процессе и лаборатории контроля качества, статус квалификации и дату следующей квалификации; необходимо делать ссылки на соответствующие валидационные отчеты);

12) обзор любых договоров, указанных в пунктах 237 - 255 Правил, с целью подтверждения их соответствия действующим требованиям (указывать все контрактные соглашения между производителем и поставщиком услуг; соглашения ежегодно необходимо оценивать на необходимость дальнейшего пересмотра либо обновления). Необходимо оценивать результаты обзора качества продукции и делать вывод о необходимости корректирующих и предупреждающих действий или проведения повторной валидации.

Система управления рисками для качества

Принципы управления рисками для качества необходимо применять ко всем аспектам фармацевтического качества. Эти аспекты включают разработку, производство, оптовую торговлю, а также проверки и процессы представления заявлений на регистрацию лекарственного средства и рассмотрения таких заявок на протяжении жизненного цикла фармацевтических субстанций, лекарственных препаратов, в том числе биологических и биотехнологических лекарственных препаратов (включая использование исходного сырья, в том числе растворителей, вспомогательных веществ, упаковочных материалов, в том числе материалов для маркировки, для лекарственных препаратов, биологических и биотехнологических лекарственных препаратов). Принципы управления рисками для качества необходимо применять ко всем разделам надлежащей производственной практики: фармацевтическая система качества, персонал, помещения и оборудования, документация, производство, контроль качества, аутсорсинг, претензии и отзыв продукции, самоинспекция. Помимо применения общепризнанных методов управления рисками допускается применение методов управления рисками, разработанных производителем. Необходимо определить группу лиц по управлению рисками, ответственных за принятие решения.

На предприятии должны быть руководитель производства, руководитель контроля качества и уполномоченное лицо. Руководители производства и контроля качества должны быть независимы друг от друга. Производитель для решения всех задач, связанных с производством и контролем качества лекарственных средств, должен иметь достаточное количество квалифицированного персонала. Должен быть в наличии документ с идентификациями подписей персонала предприятия. Должен быть исключен допуск лиц в производственные зоны, складские зоны и зоны контроля качества, которые не имеют права доступа в них; не работающий в этих зонах персонал не должен использовать для сквозного прохода указанные помещения. Необходимо иметь перечни допущенных лиц в различные помещения или иметь систему электронного допуска разрешенному персоналу. Персонал подразделения контроля качества должен иметь доступ в производственные зоны для отбора проб и проведения необходимых исследований. Для каждого сотрудника должны быть разработаны и документально оформлены должностные инструкции, в которых определены сфера ответственности и подчиненности. С должностной инструкцией каждый сотрудник должен быть ознакомлен лично под роспись. Не должно быть дублирования обязанностей и функций работников производителя. В должностной инструкции уполномоченного лица должны быть прописаны обязанности по подтверждению, что каждая серия лекарственного средства была произведена и проконтролирована в соответствии с требованиями регистрационного досье и Правил. Его обязанности могут быть переданы только другому уполномоченному(ым) лицу(ам) согласно утвержденной процедуре.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.67 из 72	

Обучение

Все сотрудники предприятия, деятельность которых может оказать влияние на качество продукции, включая технический и обслуживающий персонал, а также работников, проводящих уборку и техническое обслуживание, должны проходить обучение. Производитель должен разработать, документально оформить и утвердить процедуры по обучению персонала, в которой регламентирована периодичность последующего непрерывного обучения. Обучение должно проводиться квалифицированными и обученными сотрудниками. Персонал при поступлении на работу помимо прохождения инструктажей по охране труда, по личной гигиене и по недопустимости отклонений от регламентированных процедур, обязан пройти первичное обучение в соответствии со своими должностными обязанностями. Персонал должен проходить последующее непрерывное (периодическое) обучение, включая инструктаж по выполнению гигиенических требований. Производитель должен документально оформлять допуск к работе, который подтверждается по результатам периодического обучения. Производитель должен проводить оценку эффективности по проведенным обучениям в виде тестирования, собеседования, письменного экзамена с документальным оформлением выполненных работ.

Гигиена персонала

Производитель должен разработать, утвердить и внедрить процедуры по соблюдению требований к состоянию здоровья, санитарных правил и требований к одежде персонала. При приеме на работу каждый работник, который получает доступ в зоны производства, контроля качества и складов должен пройти профессиональное медицинское освидетельствование. Производитель должен утвердить процедуру прохождения профессионального медицинского обследования, описывающей план проведения медосмотра и последующий периодический медицинский осмотр с учетом риска, которому могут быть подвержены сотрудники. Помимо плановых медицинских осмотров, для таких работников необходимо обеспечить ежедневный медицинский контроль, обеспечивающий осведомленность производителя о состоянии здоровья персонала, которое может повлиять на качество продукции – это требование необходимо утвердить в инструкциях по гигиене. Производитель должен предпринять меры, обеспечивающие недопущение лиц с инфекционными заболеваниями или открытыми повреждениями на открытых участках тела к производству лекарственных средств. Сотрудники, занятые в производстве, техническом обслуживании, проведении испытаний и уходе за животными, при необходимости, должны быть вакцинированы соответствующими специфическими вакцинами и проходить регулярные медицинские осмотры.

Производитель должен утвердить процедуру по предотвращению любой деятельности, которая может оказать влияние на качество продукции. Персонал должен пройти обучение данной процедуре и строго соблюдать её требования.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Ознакомиться, законспектировать и разработать стандартные операционные процедуры (СОП) на определенный этап производства лекарственных препаратов.

Задание №2. Составить стандартные операционные процедуры (СОП) на мойку, уборку помещений.

Задание №3. Составить стандартные операционные процедуры (СОП) на хранение настоек, порошков, ароматные воды.

Задание №4. Решить ситуационные задачи:

1. Центр контроля качества при выборочном контроле забраковал партию таблеток. Контроль продукции выявил у полученных таблеток отклонения от требований

НД: вкрапления, сколы краев и разброс в геометрических размерах (соотношение высоты и диаметра) части таблеток. Какие этапы постадийного контроля не выполнены или оказались неэффективными, какие обязательные мероприятия (процессы) могли быть не выполнены на предприятии изготовителе в связи с данным фактом?

2. Каким образом GMP снижает риск выпуска некондиционной продукции? Мероприятия, исключают возможность указанных отклонений в параметрах качества суппозиторий папаверина?

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.68 из 72	

3. Учитывая особенности биотехнологического производства: следует ли проводить валидацию в соответствии с правилами GMP, если на заводе внедрен новый штамм продуцента или произошла незначительная замена в компонентах питательной среды?

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

Контрольные вопросы:

1. Внедрение GMP в фармацевтическую промышленность РК.
2. Каковы основные элементы GMP?
3. Какие стандарты рекомендованные GMP?
4. Какие основные термины используются?
5. Назовите принципы надлежащей производственной практики ЛС?
6. Особенности GMP для биотехнологического производства.
7. Принципы производства биотехнологических лекарственных средств.
8. Стадии биотехнологического производства: создание главного и рабочего банков клеток, поддержание рабочего банка клеток, культивирование клеток и/или ферментация, сбор, выделение и очистка продукции.
9. Персонал. Помещения и оборудование.
10. Исходные и упаковочные материалы.
11. Документация.
12. Хранение продукции, исходных и упаковочных материалов.

Занятие № 15

Тема 15: Биологическая и экологическая безопасность в биотехнологическом производстве.

Цель: Ознакомить студентов мероприятиями направленными на своевременное выявление и предупреждение возникновения неблагоприятных воздействий на окружающую среду.

Задачи обучения:

студент должен знать:

- объекты биотехнологии;
- методы биотехнологии;
- достижения биотехнологии в медицине и фармации.
- требования по производству, стандартизации, контролю качества и соблюдению экологической безопасности лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами.

студент должен уметь:

- использовать научно-методические, справочную литературу, нормативную документацию, лабораторные и опытно-промышленные регламенты, систему приемов, позволяющих получать необходимую информацию из интернет-ресурсов и современными навыками обработки и анализа полученной информации;
- проводить взаимосвязь между достижениями в области биотехнологии и генетической инженерии.

Основные вопросы темы

по базисным знаниям:

1. Латинская терминология по теме урока.
2. Оценка качества лекарств. Применяемые устройства, принцип их действия.

по теме занятия:

1. Экология, общие понятия и положения. Проблемы экологии.
2. Понятие о биологической и экологической безопасности лекарственных средств.
3. Утилизация отходов биотехнологического производства.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.69 из 72	

ИНФОРМАЦИОННО-ДИДАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

Биотехнология и проблемы экологии и охраны окружающей среды

Биотехнология как наукоемкая ("высокая") технология и ее преимущества в экологическом аспекте перед традиционными технологиями. Направления дальнейшего совершенствования биотехнологических процессов применительно к проблемам охраны окружающей среды. Малоотходные технологии. Итоги и перспективы их внедрения на биотехнологических производствах. Особенности биотехнологических производств применительно к их отходам.

Рекомбинантные продуценты биологически активных веществ и проблемы объективной информации населения. Организация контроля за охраной окружающей среды в условиях биотехнологического производства.

Классификация отходов. Соотношение различных видов отходов. Очистка жидких отходов. Схемы очистки. Аэротенки. Активный ил и входящие в него микроорганизмы.

Создание методами генетической инженерии штаммов микроорганизмов-деструкторов с повышенной способностью к деструкции веществ, содержащихся в жидких отходах. Основные характеристики штаммов деструкторов. Их неустойчивость в природных условиях.

Сохранение штаммов на предприятиях. Нормы внесения биомассы штаммов при пиковых нагрузках на очистные сооружения.

Уничтожение или утилизация твердых (мицелиальных) отходов. Биологические, физико-химические, термические методы обезвреживания мицелиальных отходов. Утилизация мицелиальных отходов в строительной промышленности. Использование отдельных фракций мицелиальных отходов в качестве пеногасителей и др.

Очистка выбросов в атмосферу. Биологические, термические, физико-химические и другие методы рекуперации и обезвреживания выбросов в атмосферу.

Единая система GLP, GCP и GMP при предклиническом, клиническом испытании лекарств и их производстве. Особенности требований GMP к биотехнологическому производству. Требования к условиям хранения сырья для комплексных питательных сред. Карантин. Правила GMP применительно к производству бета-лактамных антибиотиков.

Причины проведения валидации при замене штаммов-продуцентов и изменении составов ферментационных сред.

Вклад биотехнологии в решение общих экологических проблем. Замена традиционных производств. Сохранение природных ресурсов источников биологического сырья. Разработка новых высокоспецифичных методов анализа. Биосенсоры.

Перспективы получения, модификации и использования в защите окружающей среды феромонов, кайромонов, алломонов как природных сигнальных и коммуникативных молекул в надорганизменных системах.

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ:

ЗАДАНИЕ 1. Написать основные санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов.

ЗАДАНИЕ 2. Решите ситуационные задачи:

1. Может ли утилизация отходов биотехнологического производства лекарственных средств нанести существенный вред экологии? Какова схема утилизации жидких отходов?
2. Известно, что требования экологии часто не совпадают с регламентом фармацевтического производства в целом. Какие виды очистки и для какого рода отходов предусматривает использование активного ила и «штаммов-деструкторов»?

Методы/технологии обучения и преподавания: работа в малых группах.

Методы/технологии оценивания: устный опрос, тестирование.

Литература указана в приложении 1

Контроль:

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.70 из 72	

Контрольные вопросы:

1. Понятие о биологической безопасности лекарственных средств.
2. Виды контроля устанавливающие для обеспечения биологической безопасности.
3. Понятие о экологической безопасности лекарственных средств.
4. Утилизация отходов биотехнологического производства. Способы предупреждения попадания продуцента в окружающую среду.
5. Уничтожение твердых отходов. Современные пути утилизации.
6. Очистка жидких отходов (отходов культуральной жидкости). Этапы. Ликвидация газообразных отходов.
7. Биодegradация токсических соединений и утилизация биомассы.
8. Метоболические пути биодegradации ксенобиотиков, созданных методом генной инженерии.
9. Утилизация крахмала и сахаров.

OÑTÜSTIK QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.71 из 72	

Приложение 1

Литература

На русском языке:

основная:

- Орехов, С. Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям: учебное пособие /С.Н.Орехов. - 2-е изд., перераб. и доп.; М.: ГЭОТАР - Медиа, 2015. - 432 с
- Жакирова Н.К. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие /Н.К. Жакирова — Алматы: Эверо, 2020.

дополнительная:

- Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.3. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.
- Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2015. – 720 с.
- Фармацевтическая система качества и надлежащие фармацевтические практики : учебное пособие / Т. А. Арыстанова, Ж. М. Арыстанов. - Караганда : Medet Group, 2021. - 150 с. (Шифр 615.014/А 895-319357)
- Биотехнология өндірісіндегі технологиялық сызба нұсқа: оқу құралы / А.М.Есимова. - Қарағанды: Medet Group, 2020. - 176 б.

На казахском языке:

- Биотехнология өндірісіндегі технологиялық сызба нұсқа : оқу құралы / А. М. Есимова. - Қарағанды : Medet Group, 2020. - 176 б. с. (Шифр 663.1/Т 60-820426)
- Жатқанбаев Ж.Ж. Биотехнология – Алматы: Эверо, 2020. – 396 бет. Жатқанбаев Ж.Ж./
- Биофармация және дәрілік препараттарды биофармацевтік зерттеу: оқу құралы / Б. А. Сағындықова, Р. М. Анарбаева. - Қарағанды, 2021. - 172 б.
- Микроорганизмдер биотехнологиясы: оқу құралы /А.М.Есимова, М.Д.Касимбекова. - Қарағанды: Medet Group, 2019. - 420 б.

Электронные учебники:

- Биофармация және дәрілік препараттарды биофармацевтік зерттеу: оқу құралы / Б. А. Сағындықова, Р. М. Анарбаева. - Электрон. текстовые дан. (2,211 КБ). - Қарағанды : Medet Group, 2021. - 172 б. эл. опт. диск (CD-ROM)
Торланова Б. О.
- Фармацевтикалық биотехнология микробиология негіздерімен [Электронный ресурс] : Оқу - әдістемелік құрал (дәрістер жинағы) / Торланова Б. О., Касимбекова М. Д. - Электрон. текстовые дан. (1, 797 КБ). - Шымкент : ОҚМА, 2022. - 108 б. эл. опт. диск (CD-ROM)

Электронный ресурс:

- УМКД размещен на образовательном портале ukma.kz
- Сайт библиотечно-информационного центра академии lib.ukma.kz
- Медиатека ЮКМА <https://media.skma.edu.kz/>
- Цифровая библиотека «Aknurpress» www.aknurpress.kz пройдите регистрацию и укажите промокод SDH-28
- ОҚМА Репозиторийі <http://lib.ukma.kz/repository/>
- Республикалық жоғары оқу орындары аралық электрондық кітапхана <http://rmebrk.kz/>
- «Заң» нормативтік-құқықтық актілер базасы <https://zan.kz/ru>
- «Параграф Медицина» ақпараттық жүйесі <https://online.zakon.kz/Medicine/>
- Жакирова Н.К. Фармацевтическая биотехнология: Учебное пособие /Н.К. Жакирова — Алматы: Эверо, 2020. https://www.elib.kz/ru/search/read_book/318/
- Биологиялық препараттар өндірісінің технологиясы.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра технологии лекарств Методические указания для практических занятий	044/43-11- (2023-24) Стр.72 из 72	

Есимова А.М., Кедельбаев Б.Ш. , 2020 Есимова А.М /ЦБ Акнурpress /
<https://www.aknurpress.kz/reader/web/2668>

11. Биотехнология. Әлмағамбетов Қ.Х. , 2012 Әлмағамбетов Қ.Х. Эпиграф
<https://www.aknurpress.kz/reader/web/1058>

12. Биотехнология өндірісіндегі технологиялық сызба нұсқа.

Есимова А.М. , 2020 <https://aknurpress.kz/login>

13. Биологиялық препараттар өндірісінің технологиясы. Есимова А.М., Кедельбаев Б.Ш. ,
 2020 Есимова А.М /ЦБ Акнурpress / <https://www.aknurpress.kz/reader/web/2668>

Интернет ресурс:

1. Орехов, С. Н. Фармацевтическая биотехнология / Орехов С. Н. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 384 с. - ISBN 978-5-9704-2499-5. - Текст : электронный // URL :
<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970424995>.

html (дата обращения: 19.05.2021). - Режим доступа : по подписке.

2. Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик»
<https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2100022167#z14>

3. Фармакопея Евразийского экономического союза ЕАЭС
<https://adilet.zan.kz/rus/docs/H20EK000100>