

ANTIBIOTIKÁ, charakteristika a výroba

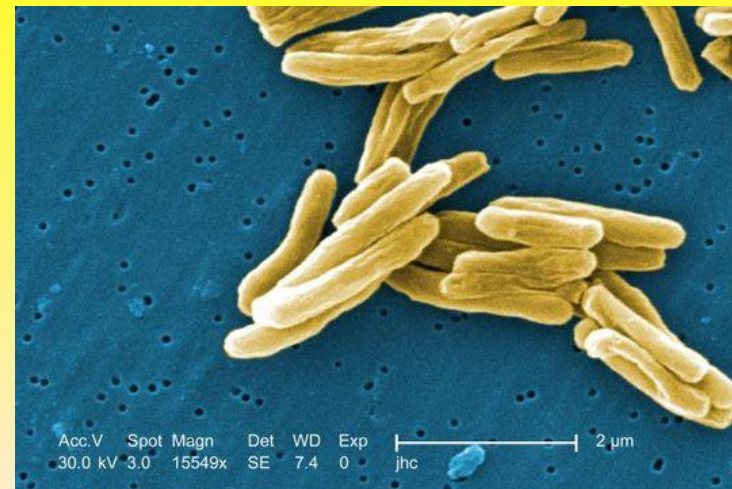
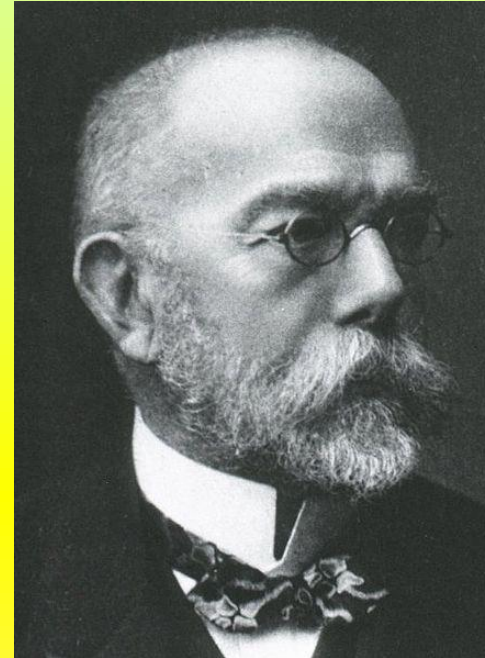
Predmet: biotechnológia

E. Kulichová

Z histórie

Prakticky počas celej histórie trápili ľudia infekčné choroby, ktoré decimovali obyvateľstvo najmä v husto osídlených oblastiach. Potom, čo sa zlepšenou hygienou a na konci 19. storočia aj vakcináciou podarilo obmedziť epidémie moru, cholery a kiahní, ostávala vážnym zdravotným problémom tuberkulóza.

V roku 1892 objavil pôvodcu tuberkulózy Robert Koch (Kochov bacil)



Z histórie

Tuberkulóza je chronicky prebiehajúca infekčná choroba, ktorá bola ešte v prvej polovici 20. storočia masívne rozšírená na celom svete. Jej výskyt opäť rastie.

Prenos:

Nákaza sa najčastejšie šíri kvapôčkovou infekciou. Zdrojom nákazy je chorý človek, ktorý vykašľáva mykobaktérie *Mycobacterium tuberculosis*.

Nebezpečné sú aj mykobaktérie *Mycobacterium bovis* – pôvodca tuberkulózy zvierat. Nákaza sa môže preniesť aj na človeka

Baktérie môžu vstupovať do organizmu aj cez poranenú kožu alebo infikované potraviny. Preto ďalšími zdrojmi ochorenia môžu byť:

- infikované zvieratá,
- kontaminované potraviny (napríklad aj nepasteriované mlieko nakazených kráv),
- ovzdušie

V druhej polovici 20. storočia sa v Európe podarilo minimalizovať výskyt choroby vďaka očkovaniam a liečiť ju vďaka antibiotikám.

Aktuálne sú problémom multirezistentné kmene mykobaktérií

Z histórie

Za objaviteľa antibiotík sa považuje Alexander Fleming

1892 – Objav baktérie *Mycobacterium tuberculosis* (Robert Koch)

1929 Objav penicilínu (Alexander Fleming)

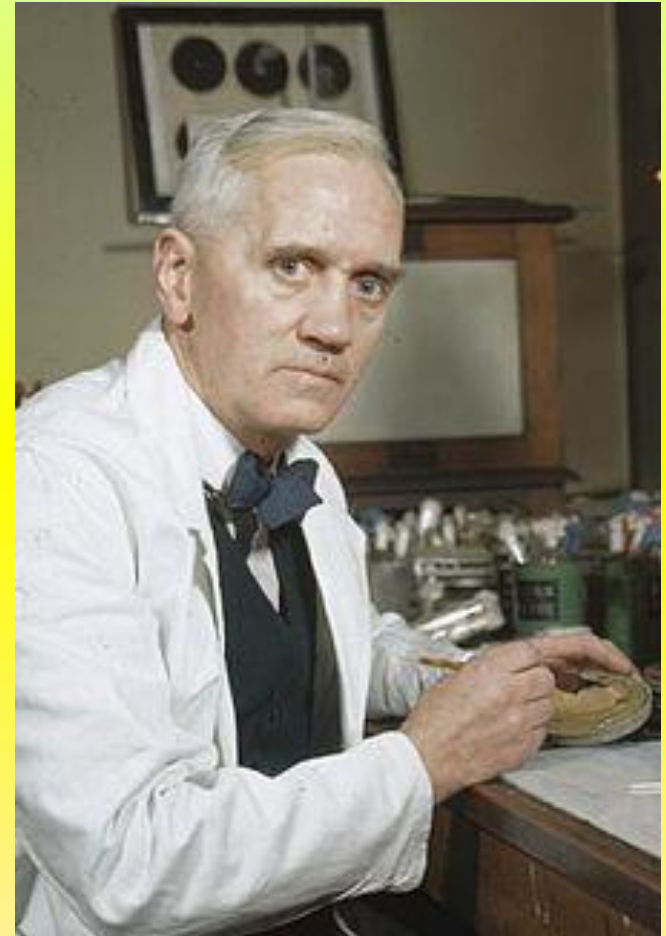
1939 Vývoj technológie priemyselnej výroby penicilínu

Základy priemyselnej výroby antibiotík položili S.A. Waksman (USA) a G. Brotz (IT)

1943 Spustenie priemyselnej výroby penicilínu v USA

1951 Spustenie priemyselnej výroby penicilínu v Československu (Slovenská Ľupča)

Dnes sa produkuje okolo 10 000 druhov rôznych antibiotík



Antibiotiká

- Názov tejto skupiny liekov je gréckeho pôvodu: anti = proti, bíos = život
- Sú vo všeobecnosti definované ako substancie, produkované mikroorganizmami, určené na potlačenie rastu alebo likvidáciu patogénnych mikroorganizmov, najmä baktérií.
- Rozličné antibiotiká likvidujú baktérie rôznym mechanizmom, napr. :
 - ničia štruktúru bunkovej membrány,
 - obmedzujú tvorbu proteínov
 - obmedzujú metabolické procesy na využitie energie v bunke.
- Môžu sa získavať izoláciou z rastlín, biochemickým pôsobením mikroorganizmov na vhodný prekursor
- Antibiotiká nemajú priamy vplyv na potláčanie vírusových ochorení.



Rozdelenie antibiotík podľa intenzity účinku

Bakteriostatický účinok

- Antibiotikum zastaví rast mikroorganizmov
- Týmto účinkom sa vyznačujú najmä makrolidy, tetracyklíny, chloramfenikol, sulfónamidy

Baktericídny účinok

- Antibiotikum zničí príslušný bakteriálny kmeň
- Týmto účinkom sa vyznačujú najmä beta-laktamové antibiotiká, medzi ktoré patria penicilíny, cefalosporíny a amoniglykozidy

Bakteriostatický účinok

Makrolidy
Tetracyklíny
Chloramfenikol
Sulfónamidy
Trimetoprim
Linkomycín, klindamycín
Etambutol
Nitrofurantoin

Baktericídny účinok

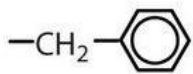
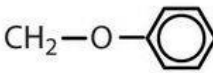
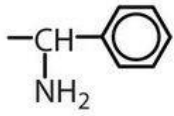
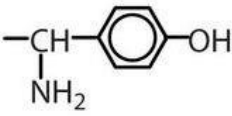
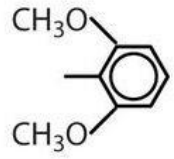
Beta-laktamové antibiotiká
Penicilíny, Cefalosporíny
Aminoglykozidy
Bacitracin
Isoniazid
Metronidazol
Polymyxíny
Pyrazinamid
Chinolony
Rifampicin
Vankomycin, teikoplanin

Penicilín a cefalosporín patria medzi beta-laktámové antibiotiká

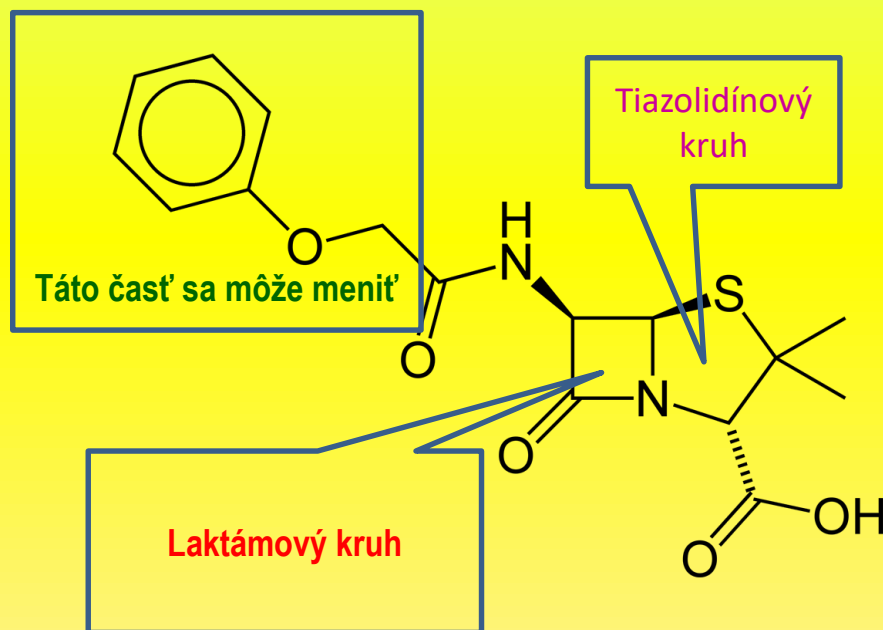
Pre beta-laktámové antibiotiká je typická prítomnosť laktámového kruhu v molekule

Bočný reťazec sa môže meniť.

Prehľad beta-laktámových antibiotík:

SKUPINA R	MENO LIEKU
	penicillin G
	penicillin V
	ampicillin
	amoxicillin
	methicillin

Beta-laktámové antibiotiká



Výroba antibiotík

Antibiotiká sa vyrábajú:

- **Fermantačným spôsobom** – teda využitím produkčných organizmov (penicilín)
- **Polosyntetickou cestou** – kombináciou použitia produkčného organizmu a chemickej syntézy – zvyčajne sa prírodná surovina chemicky upraví (ampicilín)
- **Úplne syntetickým postupom** (sulfónamidy)

Na výrobu penicilínu i ďalších antibiotík treba tri základné skupiny surovín:

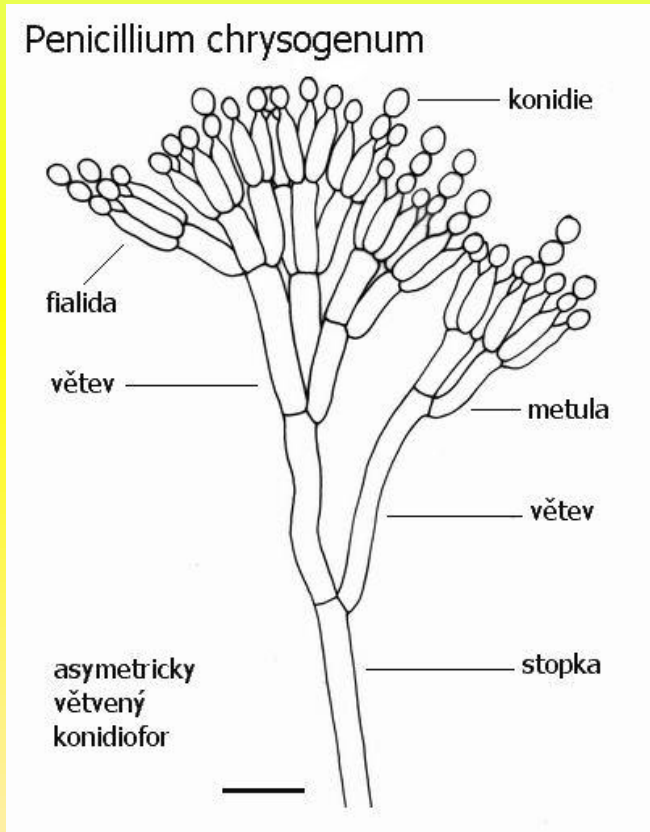
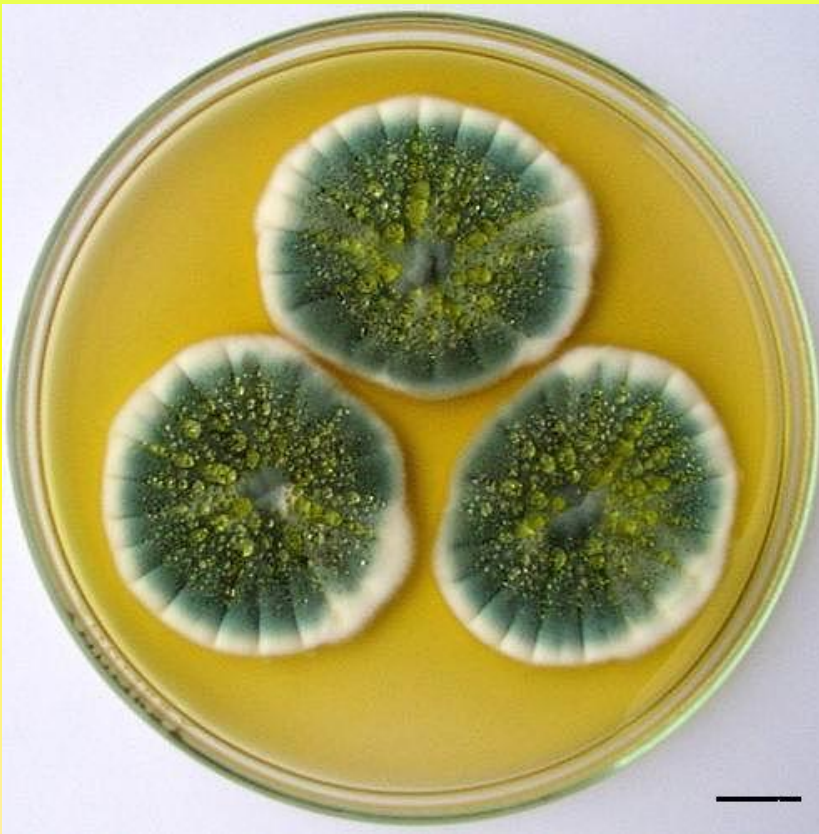
- **produkčný kmeň** (napr. kultúra príslušnej plesne),
- **produkčné médium** (skladá sa zo zdroja uhlíka, dusíka, fosforu, síry a pod.) – slúži ako výživa pre produkčný organizmus
- **prekurzor** – špecifická chemikália, ktorú produkčný organizmus „transformuje“ na príslušné antibiotikum

Výroba antibiotík

- **Produkčné kmene:**
- **Plesne**
 - *Penicilinium notatum*
 - *Penicilinium chrysogenum*
- **Pôdne baktérie – aktinomycety - streptomyces bacterium sp.**
 - Streptomyces aureofaciens*
 - Streptomyces rimosus*
- Pri biotechnologickej výrobe antibiotík sa produkčné kmene na prípravu inokula uchovávajú vo forme spór alebo vo forme mycélia.
- Podmienky skladovania musia vylúčiť kontamináciu a mutáciu kmeňa.
Na to sa používa ochranné médium (napr. glycerol) a veľmi nízka teplota (-70 °C).

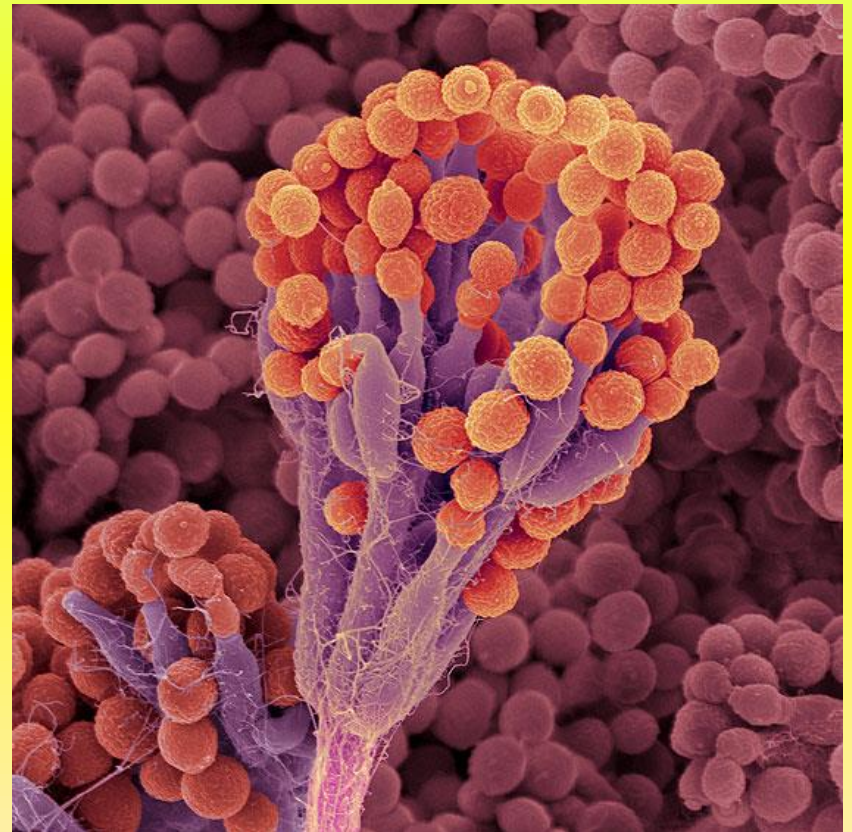
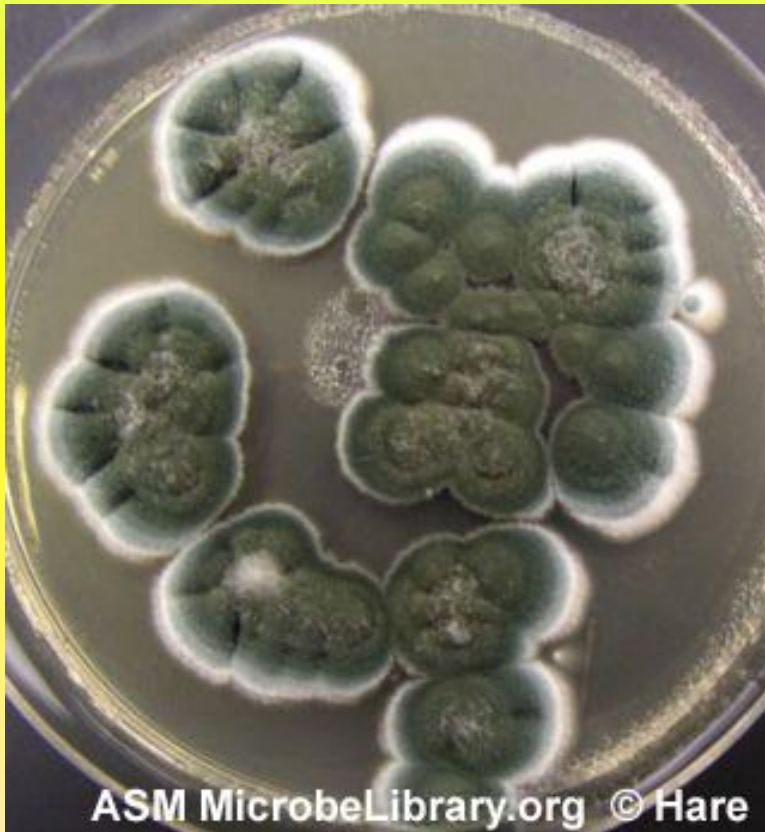
Výroba antibiotík

Produkční kmene - *penicilinium chrysogenum*



Výroba antibiotík

Produkčné kmene - *penicilinium notatum*



Výroba antibiotík

- **Produkčné médium**

je zmes látok, ktorá zabezpečuje vhodné podmienky pre rast produkčného mikroorganizmu

Produkčné médium musí obsahovať zdroje všetkých biogénnych prvkov:

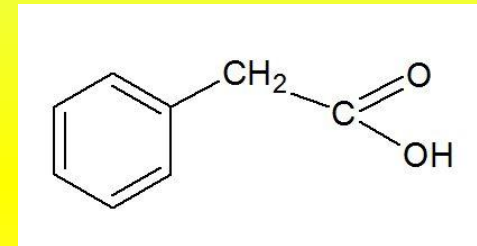
Produkčné médium obsahuje:

- **vhodný zdroj C, H, a O** (najčastejšie dextríny, škrob, sacharóza),
- **zdroj dusíka** (často je to amoniak - reguluje sa ním zároveň pH),
- **zdroj dusíka a síry** býva múka zo semien bavlníka,
- **zdrojom fosforu** je zvyčajne kyselina fosforečná, pomocou ktorej sa, podobne ako v prípade amoniaku, reguluje pH, alebo dihydrogénfosforečnany

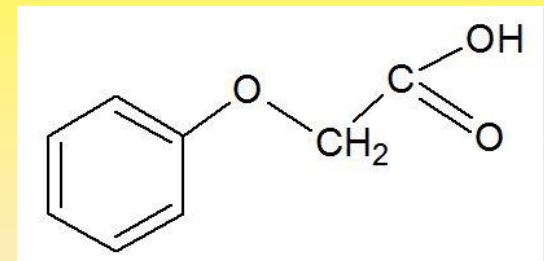
Výroba antibiotík

- **Prekurzor je látka, z ktorej mikroorganizmus vytvára cieľový produkt**
- Pretože prekurzor je zvyčajne pre produkčný organizmus toxický, pridáva sa postupne, pričom sú dve možnosti:
 - Kontinuálne pridávanie počas celého výrobného cyklu
 - Pridávanie v niekoľkých dávkach

- Pre výrobu penicilínu G (starší typ, aplikuje intramuskulárne) je prekurzorom kyselina fenylactová



- Pre výrobu penicilínu V (novší typ, aplikuje sa perorálne) je prekurzorom kyselina fenoxylactová



Výroba antibiotík - etapy

Predvýrobná etapa

Výber vhodného produkčného kmeňa, jeho zušľachtenie a zakonzervovanie tohto kmeňa

..

Cieľ: vyvinúť geneticky stabilné a výkonné produkčné organizmy

Výrobná etapa

Namnoženie spór produkčného kmeňa, realizácia vlastnej fermentácie – produkcia antibiotika

Cieľ: vyrobiť čo najviac antibiotika

Etapa izolácie a čistenia produktu

Oddelenie antibiotika od fermentačnej zmesi.

Využívajú sa:

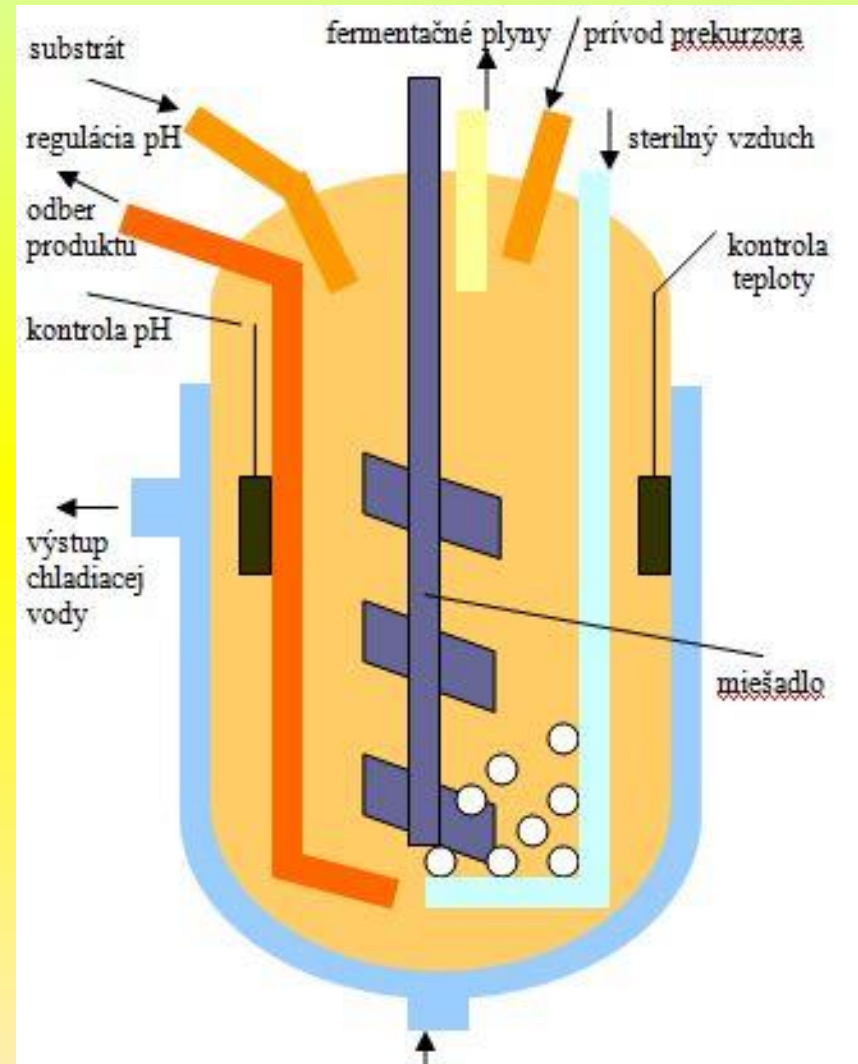
- fyzikálne,
- fyzikálno-chemické
- difúzne metódy

Cieľ: získať čo najčistejšie antibiotikum, a minimalizovať tým napríklad aj vedľajšie účinky

REAKTOR na výrobu antibiotík

- Klasický vsádzkový reaktor so submerznou kultiváciou
- Objem okolo 40 m³
- Zhotovený z antikorovej ocele (vysoká koncentrácia Fe inhibuje proces)
- **Dôležité zabezpečenia:**
 - Miešanie (turbínou, vzduchom)
 - Vetrание (odvádzanie fermentačných plynov)
 - Prívod kyslíka
- **Regulované parametre:**
 - Teplota 23 -28 °C
 - pH 6,5 až 7
 - Tlak CO₂ (nárast by spôsobil zníženie tvorby penicilínu)
 - Koncentrácia kyslíka
 - Pridávanie prekurzora

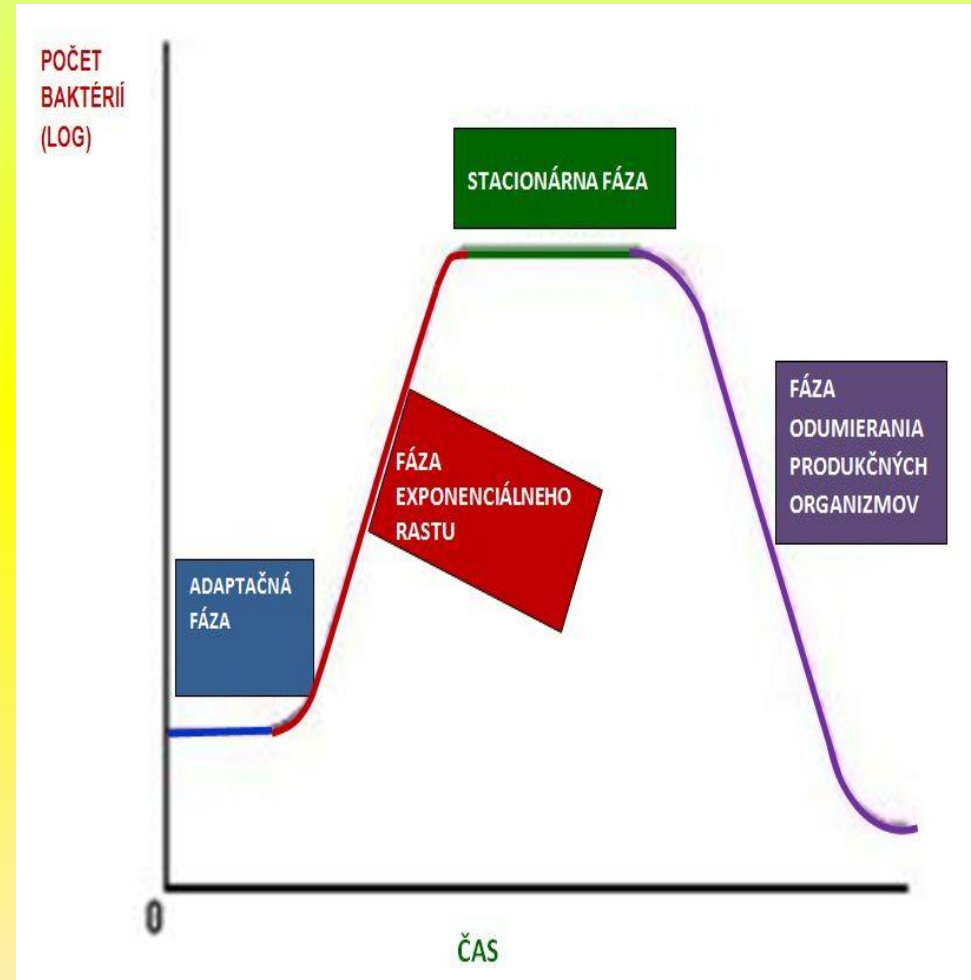
Výroba antibiotík



Výroba antibiotík

Kinetika rastu produkčného organizmu vo vsádzkovom reaktore
Z klasickej rastovej krivky mikroorganizmov sa pri výrobe antibiotík venuje pozornosť týmto fázam:

- **Adaptačná fáza (lag fáza)**
bunky plesne sa nerozmnožujú, zväčšujú svoj objem a aktivuje sa ich enzýmový systém
- **Exponenciálna fáza**
Nastáva rozmnožovanie buniek, rýchlosť tvorby nových buniek narastá
- **Stacionárna fáza**
Nastáva rovnováha medzi delením a odumieraním buniek
- **Fáza odumierania**
Bunky sa už nerozmnožujú, len odumierajú, (nastáva toxický vplyv produktov metabolizmu)



Výroba antibiotík

Najpomalšou fázou vo výrobe antibiotík je prenikanie živín cez bunkovú membránu do bunky a potom prenikanie antibiotika cez bunkovú stenu do reakčnej zmesi.

Pre produkčné mikroorganizmy sú antibiotiká tiež jedovaté, preto najväčším problémom je vyšľachtiť také produkčné organizmy, ktoré vydržia čo najvyššiu koncentráciu antibiotík.



Výroba antibiotík

Klasická izolácia penicilínu

- Reakčná zmes sa ochladí na 0 - 4°C
- pH sa zníži na 3 – 4
- Plesňové mycélium sa z reakčnej zmesi odfiltruje na rotačných filtroch
- Penicilín sa nachádza vo filtráte ako benzylpenicilín
- Benzylpenicilín sa extrahuje butylacetátom
- Extrakt sa zráža roztokom octanu draselného ako kryštalická draselná soľ penicilínu
- Produkt sa odfiltruje a vysuší vo vákuovej sušiarňi

Moderné postupy izolácie ATB

- **Nanofiltrácia** – využíva špeciálne typy filtračných membrán, ktoré selektívne zachytávajú viacmocné ióny. Využívajú sa tlaky okolo 1 MPa
- **Reverzná osmóza**
- **Elektrodialýza** využíva rôznu rýchlosť pohybu pri migrácii iónov v elektrickom poli

Vlastnosti antibiotík

Rozdelenie antibiotík podľa účinku:

- **Úzkospektrálne** pôsobia iba proti niekoľkým typom baktérii
- **Širokospektrálne** sú efektívne proti mnohým typom baktérii

Názvy antibiotík:

Väčšina antibiotík má dve mená:

obchodné, čiže značkové meno (vytvorené výrobcom) a

generické (odvodené od chemickej štruktúry antibiotika alebo od príslušnosti ku chemickej triede).

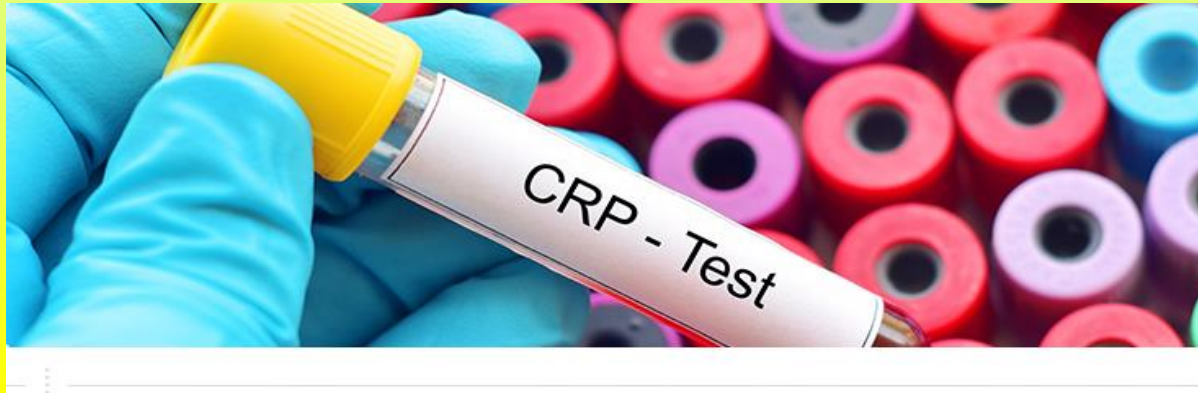
NÁZOV	Produkčný organizmus	Účinok	Model činnosti
PENICILÍN	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gram-pozitívne baktérie	Syntéza bunkovej steny
CEFALOSPORÍN	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Široko spektrálny	Syntéza bunkovej steny
ERYTROMYCÍN	<i>Streptomyces erythreus</i>	Gram-pozitívne baktérie	Proteínová syntéza
TETRACYKLÍN	<i>Streptomyces rimosus</i>	Široko spektrálny	Proteínová syntéza
STREPTOMYCÍN	<i>Streptomyces griseus</i>	Gram-negatívne baktérie	Proteínová syntéza
VANKOMYCÍN	<i>Streptomyces orientalis</i>	Gram-pozitívne baktérie	Proteínová syntéza
GENTAMYCÍN	<i>Micromonospora purpurea</i>	Široko spektrálny	Proteínová syntéza
NEOMYCÍN	<i>Streptomyces fradiae</i>	Široko spektrálny	Proteínová syntéza
RIFAMYCÍN	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Tuberkulóza	Proteínová syntéza

Vlastnosti antibiotík – vedľajšie účinky

Antibiotiká pôsobia aj na črevnú mikroflóru – ničia baktérie v tráviacom trakte. Výsledkom je niekoľko vážnych vedľajších účinkov:

- Hnačka – antibiotiká likvidujú črevné baktérie, s ktorými žijeme v symbióze. Riziko takejto hnačky je dehydratácia pacienta
- Rezistencia na antibiotiká – vzniká najmä vtedy, ak sa nedoberie dávka, alebo ak sa antibiotiká často striedajú
- Poškodenie rastových chrupaviek – je rizikové najmä v prípade fluorochinolónov – smú sa predpisovať len dospelým pacientom
- Alergie – najčastejšie na tetracyklíny
- Aplastická anémia – útlm krvotvorby – najmä pre chloramfenikol
- Poškodenie obličiek

Vlastnosti antibiotík – vedľajšie účinky



- Vzhľadom na množstvo vedľajších účinkov je potrebné obmedzovať užívanie antibiotík na prípady, kedy je to naozaj potrebné.
- Na rozlíšenie bakteriálnych a vírusových infekcií sa používa najčastejšie CRP test

Vlastnosti antibiotík - rezistencia

ATB rezistencia je dvojaká:

- prirodzená (primárna) – geneticky podmienená rezistencia niektorých baktérií určité antibiotiká: baktérie jednoducho neobsahujú štruktúry, ktoré by boli na pôsobenie antibiotika citlivé (napríklad rezistencia mykoplazmiem, ktoré nemajú bunkovú stenu na antibiotiká spôsobujúce poškodenie bunkovej steny),
- získaná (sekundárna) – vzniká u kmeňov mikrobiálnych druhov pôvodne citlivých na antibiotikum, ktoré sa počas liečby alebo po liečbe stanú rezistentnými na dané antibiotikum. V baktérii dôjde k zmene genetického vybavenia.

Vlastnosti antibiotík - rezistencia

- **Individuálne** vzniká rezistencia na konkrétne antibiotikum, ktoré sa napríklad nedobralo, alebo sa bralo neopodstatnene – napríklad pri vírusovej infekcii - problém vzniká z nadspotreby antibiotík
- **Kolektívna** rezistencia môže vzniknúť na určité druhy antibiotík, ak sa tieto používajú v živočíšnej výrobe (napríklad preventívne pri chove hovädzieho dobytku, hydiny, rýb...)

Úlohy na opakovanie:



- ❖ Vysvetlite, prečo bolo potrebné zaviesť pasterizáciu mlieka
- ❖ Rozhodnite, či je vhodné užívať antibiotiká pri ochorení na sezónnu chrípku. Svoje rozhodnutie zdôvodnite
- ❖ Vysvetlite, prečo niekedy predpísané antibiotiká „nezaberú“. Pokúste sa navrhnúť postup, ako by ste pomocou mikrobiologických testov vyľadali vhodné antibiotikum pre pacienta
- ❖ Vymenujte aspoň tri rastliny, ktoré obsahujú antibiotikám podobné látky
- ❖ Vysvetlite, prečo po liečbe antibiotikami môžu mať pacienti tráviace problémy
- ❖ Uvedte, v ktorých liekových formách sa najčastejšie podávajú antibiotiká
- ❖ Diskutujte o výhodách moderných oddeľovacích metód, ktoré sa využívajú pri izolácii antibiotík