

Культуры клеток и тканей, методы культивирования
вирусов, вирусологические методы исследования.
Особенности химиотерапии вирусных инфекций.
Механизмы антибиотикорезистентности и
современные методы их определения



ВЫПОЛНИЛ: ЕРКЕН ДАСТАН

248-ОМ

ПРОВЕРИЛА: АКИМБЕКОВА Э.М

Содержание:



- Введение
- Культура клеток и тканей
- Виды культур клеток и тканей
- Культивирование вирусов
- Вирусологические методы исследования
- Особенности химиотерапии вирусных инфекций
- Механизмы антибиотикорезистентности и современные методы их определения

Введение



- Для количественного накопления вирусов наиболее удобную систему представляют культуры клеток. В конце прошлого столетия нашли возможность сохранения жизнеспособности тканей и клеток в искусственных условиях и положили начало глубоким научным исследованиям тканевых культур. Культивирование вирусов помогает решить ряд теоретически проблем, связанных с изучением особенностей взаимодействия "вирус-клетка". Кроме того решение целого ряда прикладных задач, связанных с диагностикой и производством препаратов для профилактики вирусных инфекций невозможно без накопления вирусосодержащего сырья.

Культуры клеток и тканей



- - метод сохранения в жизнеспособном состоянии клеток, участков тканей, органов или их частей вне организма *in vitro* с созданием условий, обеспечивающих питание, газообмен и удаление продуктов метаболизма, а также асептических условий, достигаемых, в частности, путем добавлением антибиотиков.

Виды культур тканей и клеток



I. Культуры переживающих эксплантатов тканей.

II. Культуры растущих тканей:

- 1) культуры фиксированных кусочков ткани;
- 2) однослойные культуры клеток:

1. первично-трипсинизированные (однократно культивируемые);
2. перевиваемые клеточные культуры;
3. полуперевиваемые культуры клеток (штаммы диплоидных клеток человека и животных)

III. Суспензионные культуры растущих клеток.

Культуры клеток и тканей



- Клеточные и тканевые культуры позволяют исследовать такие важные для медицины проблемы, как перерождение нормальных клеток в опухолевые, всесторонне изучать их свойства, чувствительность клеток к физическим и химическим факторам, в т. ч. к лекарствам, а также определять потенциальную мутагенность и канцерогенности этих факторов. Разработка методов длительного культивирования позволяет формировать банки клеточных линий, обладающих определёнными генетическими и биохимическими свойствами. На этой основе создаются методы криоконсервации – сохранение в условиях глубокого охлаждения клеток, тканей и органов для трансплантации, в качестве резервного генофонда редких и исчезающих биологических видов, а также для других целей. С кон. 20 в. стали возникать банки, в которых хранятся замороженные стволовые клетки, используемые для лечения самых различных болезней и травм. Клеточные культуры служат также удобными объектами для изучения тканевой несовместимости и других иммунных реакций. Они используются в диагностике вирусов и для получения вакцин. Таким образом, культура клеток и тканей применяется для решения как фундаментальных теоретических проблем (таких, напр., как клеточная дифференцировка), так и различных практических задач, особенно в области медицины. Этот метод – неотъемлемая составная часть геной инженерии, клеточной инженерии, клонирования и других направлений экспериментальной биологии.

Культивирование вирусов



- Для культивирования вирусов используют ряд методов. Это культивирование в организме экспериментальных животных, развивающихся куриных вибрионах и культурах тканей (чаще — эмбриональные ткани или опухолевые клетки). Для выращивания клеток тканевых культур используют многокомпонентные питательные среды (среда 199, среда Игла и др.). Они содержат индикатор измерения рН среды и антибиотики для подавления возможного бактериального загрязнения. Культуры тканей могут быть переживающими, в которых жизнеспособность клеток удается сохранить лишь временно, и растущими, в которых клетки не только сохраняют жизнедеятельность, но и активно делятся.

Культивирование вирусов



- Для культивирования вирусов используют:
 1. **Лабораторные животные:** белые мыши (при выделении вирусов бешенства, энцефалитов, гриппа и вирусов Коксаки), хорьки (вируса гриппа), кролики (вирусов оспы, бешенства), обезьяны (вируса полиомиелита).
 2. **Культуры клеток** готовят из тканей животных или человека. Культуры подразделяют на первичные (неперевиваемые), полуперевиваемые и перевиваемые.
 3. **Куриные эмбрионы** (7— 13-дневные). Преимуществом этого метода является отсутствие спонтанных вирусных инфекций, а замкнутая полость эмбриона служит надежной защитой от попадания микроорганизмов из окружающей среды.

Культивирование вирусов



- В зависимости от свойств вируса и типа зараженных им клеток исходом взаимодействия вируса с клеткой могут быть следующие изменения культур клеток:
 1. Цитопатический эффект (ЦПЭ) — развитие дегенеративных процессов в клетках.
 2. Образование симпластов — гигантских многоядерных клеток в результате слияния цитоплазмы нескольких клеток и митотического деления.
 3. Образование включений — одно из проявлений ЦПЭ.
 4. Увеличение массы вирусов — образование бляшек или колоний вирусов (например, у вирусов оспы, кори, полиомиелита и др.)

Вирусологические методы исследования



- Вирусологические методы исследования основаны также на иммунологических процессах (взаимодействие антигена с антителами), биологических свойствах вируса (способность к гемагглютинации, гемолизу, ферментативная активность), особенностях взаимодействия вируса с клеткой-хозяином (характер цитопатического эффекта, образование внутриклеточных включений и т.д.).

Вирусологические методы исследования



Прямые:

- электронная микроскопия с окрашиванием вирусов методом негативного контрастирования
- иммунная электронная микроскопия, основанная на взаимодействии специфических антител с вирусами с образованием комплексов
- твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием меченных ферментами антител
- реакция иммунофлюоресценции (РИФ) – прямая или непрямая – основана на применении антител, связанных с флюоресцентным красителем
- цитологические методы основаны на микроскопическом исследовании окрашенных мазков, биоптатов, материалов аутопсии
- молекулярные методы – молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот и полимеразная цепная реакция

Вирусологические методы исследования



Непрямые

- по цитопатическому действию,
- в реакции гемадсорбции,
- по цветной пробе,
- по результатам реакции торможения гемагглютинации,
- по изменениям или их отсутствию в куриных эмбрионах или культурах ткани,
- по выживаемости чувствительных животных.

Вирусологические методы исследования



СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ВИРУСОЛОГИИ

- вирусологические методы исследования, основанные на реакции антиген-антитело. При этом чаще всего используются парные сыворотки крови, которые берутся с интервалом в несколько недель. При нарастании титра антител в 4 и более раз реакция считается положительной.

Особенности химиотерапии вирусных инфекций



- Одним из крупнейших достижений медицины второй половины XX века является широкое использование химиотерапии. **Химиотерапия** - это лечение инфекционных и опухолевых заболеваний химическими препаратами, не являющимися продуктами реакции организма и возбудителя. Препараты, используемые для химиотерапии, называются химиотерапевтическими.

Особенности химиотерапии вирусных инфекций



- От других фармакологических средств химиотерапевтические средства существенным образом отличаются тем, что при химиотерапевтическом лечении взаимодействуют три фактора: макроорганизм, микроорганизм и лекарство, тогда как при других методах фармакотерапии (симптоматическая, заместительная) — макроорганизм и лекарство. В первую очередь это связано с тем, что ряд химиотерапевтических средств избирательно (селективно) взаимодействуют с микроорганизмом, замедляют его развитие, останавливают рост и тем самым обладают избирательной токсичностью

Антибиотикорезистентность



- Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов является подавление жизнедеятельности возбудителя инфекционной болезни в результате угнетения более или менее специфичного для микроорганизмов метаболического процесса. Угнетение происходит в результате связывания антибиотика с мишенью, в качестве которой может выступать либо фермент, либо структурная молекула микроорганизма.
- Антибиотикорезистентность - снижение восприимчивости бактерий к противомикробным препаратам, которые были созданы для их уничтожения.

Антибиотикорезистентность



- Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть природной и приобретенной.
 1. Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны. Природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется.
 2. Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретенную устойчивость. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Антибиотикорезистентность



- Известны следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:
 1. Модификация мишени действия.
 2. Инактивация антибиотика.
 3. Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс).
 4. Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки.
 5. Формирование метаболического "шунта".

Антибиотикорезистентность



- Анализ на антибиотикорезистентность можно провести с использованием различных методов, самыми популярными из которых считаются:
- Метод дисков, или диффузия АМП в агар по Кирби-Байер
- Метод серийных разведений
- Генетическая идентификация мутаций, вызывающих лекарственную резистентность.