

# Лекция № 7.

## Медицинская биотехнология и генная инженерия. Антимикробная профилактика и терапия

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

2014-2015

Достижения научно- технического прогресса способствовали развитию новых биологических технологий создания диагностических, лечебных и профилактических препаратов, решению проблем сбалансированности питания, экологических проблем. *Основные принципы биотехнологии- ферментация, культивирование микроорганизмов, растительных и животных клеток, генная и клеточная инженерия.* Генная инженерия- сердцевина современной биотехнологии.

На основе достижений генетики разработаны высокоточные *методы диагностики и идентификации микроорганизмов-* определение плазмидного профиля, рестрикционный анализ, ДНК- гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и мн.др. Методы основаны на использовании ряда специфических ферментов- рестриктаз (ферментов, расщепляющих ДНК в специфических участках), лигаз или синтетаз (обеспечивают соединение двух молекул), в частности ДНК- лигаз (получение рекомбинантных молекул ДНК), полимераз (ДНК- зависимая ДНК- полимераза обеспечивает ПЦР- многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности).

Плазмиды (F- плазмиды) и вирусы (бактериофаги) используют в генной инженерии в качестве *векторов* для переноса генетического материала (генов). *Метод клонирования* заключается в том, что выделенный фрагмент (ген) вводится в состав плазмиды или другой самореплицирующейся системы и накапливается в размножающихся клетках. Практический вариант использования: микроорганизмы-продуценты биологически активных веществ (в том числе вакцин). *Гибридную технологию* используют для получения *моноклональных антител (МКА)*.

Кроме клонирования для получения генов используют секвенирование и химический синтез. С помощью генно-инженерных методов получают вакцины, антигены, диагностикумы, гормоны, иммуномодуляторы. Одним из крупных разделов биотехнологии является производство антибиотиков и различных химиотерапевтических препаратов антибактериального действия.

Методы воздействия на микроорганизмы по виду использованного фактора можно разделить на физические и химические, по характеру воздействия- на неизбирательные (обеззараживание- дезинфекция, стерилизация) и избирательные (химиотерапевтические).

### *Физические методы.*

1. Термическая обработка- прокаливание, кипячение, пастеризация, автоклавирование.

2. Облучение- ультрафиолетовое, гамма- и рентгеновское, микроволновое.

3. Фильтрация (оптимально- бактериологические фильтры с диаметром пор около 200 нм).

### *Химические методы.*

1. Неспецифического действия- *дезинфектанты* (обработка помещений и др.), *антисептики*- обработка живых тканей). Среди них- препараты йода и хлора, спирты, альдегиды, кислоты и щелочи, соли тяжелых металлов, катионные детергенты, фенолы, окислители, природные препараты- деготь, ихтиол, хлорофиллит.

2. Избирательно подавляющие жизнедеятельность микроорганизмов- антибиотики и химиотерапевтические препараты.

Эре антибиотикотерапии предшествовал период разработки антимикробных химиопрепаратов. Некоторые вехи: в 1891г. Д.А. Романовский сформулировал основные принципы химиотерапии инфекционных болезней, предложил хинин для лечения малярии, П. Эрлих в 1906г. предложил принцип химической вариации.

Синтезированы производные мышьяка сальварсан и неосальварсан, предложен химиотерапевтический индекс. Круг химиопрепаратов постепенно расширялся. В 1932г. открыты подходы к созданию сульфаниламидных препаратов. Однако поистинне революционное значение имело открытие антибиотиков.

Одним из универсальных механизмов антогонизма микроорганизмов является синтез *антибиотиков*, которые тормозят рост и размножение микроорганизмов (бактериостатическое действие) или убивают их (бактерицидное действие). ***Антибиотики- вещества, которые могут быть получены из микроорганизмов, растений, животных тканей и синтетическим путем, обладающие выраженной биологической активностью в отношении микроорганизмов.***

Таких веществ известно несколько тысяч, однако реально используют значительно меньше. Существует ряд требований к антибиотикам, существенно ограничивающих их терапевтическое применение:

- эффективность в низких концентрациях;
- стабильность в организме и при различных условиях хранения;
- низкая токсичность или ее отсутствие;
- выраженный бактериостатический и (или) бактерицидный эффект;
- отсутствие выраженных побочных эффектов;

- отсутствие иммунодепрессивного воздействия.

Первыми открытыми антибиотиками были пенициллин (Флеминг) и стрептомицин (Ваксман).

Антибиотики могут быть разделены по происхождению, направленности и спектру действия, по механизму действия.

*По происхождению* антибиотики могут быть:

- бактериального (полимиксин, грамицидин);
- актиномицетного (стрептомицин, левомицетин, эритромицин);
- грибкового (пенициллин);
- растительного (рафанин, фитонциды);
- животного происхождения (интерфероны, лизоцим).

Больше всего известно антибиотиков актиномицетного происхождения. Актиномицеты- преимущественно почвенные микроорганизмы. В условиях большого количества и разнообразия почвенных микроорганизмов их антогонизм, в том числе с помощью выработки антибиотиков- один из механизмов их выживания.

*По спектру действия* антибиотики разделяют на:

- действующие преимущественно на грамположительную микрофлору- пенициллин, эритромицин;

- действующие преимущественно на грамотрицательную микрофлору- полимиксин;
- широкого спектра действия ( на грам-плюс и грам-минус флору)- стрептомицин, неомицин;
- противогрибковые- нистатин, амфотеррицин, леварин, низорал;
- противотуберкулезные- стрептомицин, канамицин;
- противоопухолевые- рифампицин;
- противовирусные- интерферон, зовиракс, ацикловир.

*Антибиотики разделяют по механизму действия:*

- ингибиторы синтеза пептикогликана клеточной стенки ( пенициллин, цефалоспорин, ванкомицин, ристомицин). Действуют на имеющих клеточную стенку растущие бактерии, не действуют на L-формы, покоящиеся формы бактерий;
- ингибиторы синтеза белка (стрептомицин, левомицетин, тетрациклин);
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов и аминокислот (налидиксовая кислота, рифампицин);
- ингибиторы синтеза мембраны и цитоплазматической мембраны грибов (нистатин, полимиксин).

## Побочное действие антибиотиков.

*Для макроорганизма:*

- токсическое действие;
- дисбактериозы;
- аллергические реакции;
- иммунодепрессивное действие;
- эндотоксический шок.

*Для микроорганизмов :*

- формирование атипичных форм микробов;
- формирование антибиотикорезистентных и антибиотикозависимых форм микроорганизмов.

## Биохимические и генетические механизмы лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Существует два типа лекарственной устойчивости- естественная (природная) и приобретенная (в результате мутаций, обмена R-плазмидами др.).

*Естественная лекарственная устойчивость* является видовым признаком, чаще связана с недоступностью антибиотика к его мишени, т. е. невозможностью осуществления его механизма действия. В природных условиях, особенно в почве, микроорганизмы находятся в

конкурентной борьбе за субстраты. Антибиотики- один из селективных факторов отбора. Микроорганизмы- продуценты антибиотиков защищены от синтезируемых антибиотиков генетическими механизмами (генетически детерминированная устойчивость, кодируемая в хромосоме или обусловленная наличием R-плазмид). Микроорганизмы в условиях совместного обитания вынуждены вырабатывать устойчивость к антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам у микробов может быть связана с *негенетическими факторами* (низкая метаболическая активность, переход в L- форму).

Основную роль в лекарственной устойчивости принадлежит R-плазмидам, способным передаваться в другие бактерии и формировать своеобразный *генофонд лекарственной устойчивости* микроорганизмов.

Резистентность современных стафилококков к пенициллину доходит до 100%.

*На биохимическом уровне* в формировании резистентности могут участвовать различные механизмы.

1. Разрушение молекулы антибиотика (пенициллины и другие бета-лактамы разрушаются ферментом бета-лактамазой).
2. Модификация структуры молекулы антибиотика, приводящая к

утрате биологической активности ( так действуют изоферменты).

3. Изменение структуры мишеней, чувствительных к антибиотику (белков 70S рибомос- устойчивость к тетрациклинам, стрептомицину, макролидам, гираз- к хинолонам, рнк- полимераз- к рифампицину, пенициллинсвязывающих белков- транспептидаз- к бета- лактамам).

4. Образование бактериями “обходного” пути метаболизма.

5. Формирование механизмов активного выведения антибиотика из клетки.

*Из-за формирования антибиотикоустойчивых популяций микроорганизмов с целью эффективного лечения необходимо предварительно определять чувствительность данного антибиотика к выделенной культуре возбудителя.*

Основными методами определения *антибиотикочувствительности бактерий in vitro* является метод серийных разведений, диффузии в агар (бумажных дисков), определение способности к продукции бета-лактамазы, *in vivo*- на модели безмикробных животных, определение концентрации антибиотиков в крови и моче.

*Метод диффузии в агар* с применением стандартных дисков, пропитанных различными антибиотиками в определенных концентрациях (зависят от терапевтической дозы и соответствуют

рекомендациям ВОЗ). Основан на использовании стандартных питательных сред, дисков и методов. Оценка результатов связана с существованием зависимости между размером зоны подавления роста исследуемых культур вокруг дисков и значениями *минимальных подавляющих концентраций (МПК)* соответствующих антибиотиков (чувствительностью микроорганизмов). Имеются специальные таблицы для оценки результатов, в соответствии с которыми культуры определяют как чувствительные, умеренно устойчивые и устойчивые (резистентные) к тестируемому антибиотику.

*Метод серийных разведений* антибиотиков позволяет более точно определить МПК, однако из-за громоздкости применяется реже.

*Бета-лактамазный тест* (определение способности к образованию бета-лактамаз) чаще определяют методом дисков с *нитроцефином* - цефалоспорином, изменяющим окраску дисков при гидролизе.

Положительный тест свидетельствует о резистентности бактерий ко всем бета-лактамаза-чувствительным пенициллинам.

Существует ряд причин, обуславливающих различную чувствительность микроорганизмов к антибиотикам *in vitro* и *in vivo*.

На антимикробную активность *in vitro* влияют многие факторы, в том числе :

- рН среды;
- компоненты среды;
- концентрация микроорганизмов;
- условия и время культивирования.

На антимикробную активность препаратов *in vivo* также влияют различные факторы, из которых необходимо отметить:

- фармакодинамику препарата в организме (скорость всасывания, выведения, расщепления и т.д.);
- локализацию микробов в организме (особенно внутриклеточную локализацию).