Лекция № 7.

Медицинская биотехнология и генная инженерия. Антимикробная профилактика и терапия

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ2014-2015

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: микроорганизмыпродуценты биологически активных веществ (в том числе вакцин). Гибридомную 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. Фильтрование (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, хлорофиллипт.
- 2. Избирательно подавляющие жизнедеятельность микроорганизмовантибиотики 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).

<u>Антибиотики могут быть разделены по происхождению,</u> 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.

<u>Биохимические и генетические механизмы лекарственной устойчивости микроорганизмов.</u>

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 беталактамные антибиотики разрушаются ферментом беталактамазой).
- 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 беталактамазы, 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 соотвествуют

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, обусловливающих 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).