Министерство образования и науки Российской Федерации

Сибирский федеральный университет

**АНТИБИОТИКИ**

**Методические указания к практическим занятиям**

Красноярск

СФУ

2012

УДК

ББК

А

Рецензенты:

Составители: Н.И. Сарматова

А Антибиотики: Методические указания к практическим занятиям [Текст] / сост. Н.И. Сарматова. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2012. – 29 с.

ISBN

Методические указания составлены в соответствии с учебным планом и программой по дисциплине «Антибиотики». Пособие содержит тематический план практических занятий, контрольные вопросы; представлены источники основной и дополнительной литературы в соответствии с темами дисциплины. Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по направлению «Биология», магистерская программа «Микробиология и биотехнология».

© Н.И. Сарматова

© ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный

университет», 2012

**СОДЕРЖАНИЕ**

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ 4

1 СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИКА ПОДГОТОВКИ К СЕМИНАРСКИМ ЗАНЯТИЯМ 5

1.1 Перечень тем для подготовки к практическим (семинарским) занятиям 5

Модуль 1. Общие вопросы учения об антибиотиках 5

Занятие 1. Принципы классификации антибиотиков 5

Занятие 2. Практическое применение антибиотиков 6

Модуль 2: Выделение и условия культивирования продуцентов антибиотических веществ 7

Занятие 3. Лабораторное культивирование микроорганизмов – продуцентов антибиотических веществ 7

Занятие 4. Основные этапы промышленного получения антибиотиков 8

Занятие 5. Пути повышения антибиотической продуктивности 9

Модуль3: Характеристика основных групп антибактериальных препаратов 10

Занятие 6. Бета-лактамные антибиотики. Пенициллины 10

Занятие 7. Бета-лактамные антибиотики. Цефалоспорины 12

Занятие 8. Полиены – противогрибковые соединения 13

Занятие 9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам 15

Занятие 10. Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков 16

Модуль 4: Характер и механизм биологического действия антибиотиков 19

Занятие 11. Антибиотики – ингибиторы функционирован6ия клеточной мембраны 19

Занятие 12. Антибиотики, ингибирующие процессы образования клеточной стенки бактерий 20

Занятие 13. Антибиотики, ингибирующие процесс биосинтезе белка 22

Занятие 14. Антибиотики – ингибиторы репликации и транскрипции ДНК и РНК 25

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 27

общие сведения

Наука об антибиотиках – сравнительно молодая синтетическая ветвь современного естествознания. Но в, то, же время одна из стремительно развивающихся отраслей биологической науки. Она представляет интерес не только для теоретиков, изучающих биологические процессы, протекающие в микробной клетке, но и для специалистов – биотехнологов, экологов, биохимиков. Это связано с поиском новых антибиотических веществ, который проводится как с применением традиционных, так и новых методов, включающих использование клеточной и генной инженерии, приемов, способствующих пробуждению «молчащих» генов, ответственных за биосинтез антибиотиков. Велика роль исследований, решающих такие конкретные задачи:

- подавление в клетках патогенного микроорганизма определенной мишени; получение препаратов, устойчивых к деструктивному воздействию ферментов микроорганизмов;

- выделение антибиотических веществ, инактивирующих ферменты, разрушающие практически ценные антибиотики;

- выделение биологически активных соединений, подавляющих развитие резистентных микроорганизмов.

Не уменьшается интерес исследователей и практиков к химической и биологической модификации широко известных и новых антибиотиков. Следует изучать и то негативное влияние, которое оказала наука об антибиотиках и ее практическое применение, на экологическую стабильность нашей планеты. Несомненно, наука об антибиотиках имеет большое познавательное и практическое значение.

Целью преподавания дисциплины является формирование у студентов-биологов глубоких базовых теоретических и практических знаний в области науки об антибиотиках с точки зрения современных представлений о возможности получения наиболее эффективных антибиотических веществ и разработки подходов к практическому применению средств, снижающих возникновение устойчивых к ним форм микроорганизмов.

Задачами изучения дисциплины «Антибиотики» являются:

* формирование умений и навыков использования стандартных микробиологических методов для обнаружения и выделения микробов – продуцентов антибиотических веществ
* знакомство с современными методами и условиями культивирования микроорганизмов - продуцентов антибиотических веществ при лабораторном и промышленном культивировании

Дисциплина читается на 2 курсе обучения по магистерской программе 020400.68.01 «Микробиология и биотехнология». Общая трудоемкость дисциплины составляет 72 часа. Аудиторные занятия составляют 33,3 % общего времени, отведенного на изучение дисциплины, на практические занятия отводится 16 часов.

*Таблица 1. Объем дисциплины и виды учебной работы*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид учебной работы | Всего  зачетных  единиц  (часов) | Семестр |
| 12 |
| **Общая трудоемкость дисциплины** | **2,0 (72)** | **2,0 (72)** |
| **Аудиторные занятия:** | **0,67 (24)** | **0,67 (24)** |
| Лекции | 0,22 (8) | 0,22 (8) |
| Практические занятия (ПЗ) | 0,44 (16) | 0,44 (16) |
| **Самостоятельная работа:** | **1,33 (48)** | **1,33 (48)** |
| изучение теоретического курса (ТО) | 1,11 (40) | 1,11 (40) |
| реферат | 0,22 (8) | 0,22 (8) |
| **Вид итогового контроля** | **зачет** | **зачет** |

1 СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИКА ПОДГОТОВКИ К СЕМИНАРСКИМ ЗАНЯТИЯМ

Для подготовки к практическим (семинарским) занятиям студенты получают темы за неделю да начала занятия, подбирают и изучают материал, прорабатывая основную и дополнительную литературу.

При подготовке к занятию студенты должны пользоваться пособием по методическому обеспечению самостоятельной работы, в котором приведен список вопросов для самоподготовки по темам семинарских занятий. Вопросы для самоподготовки помогут студентам выявить в изучаемых материалах главные содержательные моменты, целенаправленно изучать научную и учебно-методическую литературу, подготовиться к промежуточному и итоговому контролю. Формы проведения занятий – индивидуальные выступления студентов, групповое обсуждение с постановкой дополнительных вопросов.

При проведении занятий используются мультимедийные технологии, в частности презентации PowerPoint, с применением мультимедийного проектора, возможностью работы с электронной доской, компьютером, имеющим выход в Интернет. Выступление студента-докладчика по реферату должно сопровождаться презентацией (текстовой, табличной, графической и т.д.).

1.1 Перечень тем для подготовки к практическим (семинарским) занятиям

Модуль 1. Общие вопросы учения об антибиотиках

Занятие 1. Принципы классификации антибиотиков

Классификации антибиотиков различаются в зависимости от того, какие цели преследуют при этом исследователи различных профилей. Так, например, для биолога интерес представляет классификация по штаммам-продуцентам, для врача – по спектру действия на различных возбудителей и т. д. В зависимости от продуцирующих организмов антибиотикимогут быть разделены на следующие группы:

1. Образуемые эубактериями.

2. Образуемые бактериями рода *Streptomyces.*

3. Образуемые несовершенными грибами.

4. Образуемые грибами классов базидио- и аскомицетов.

5. Образуемые лишайниками, водорослями, низшими растениями.

6. Образуемые высшими растениями.

7. Образующиеся в организмах животных.

По механизму биологического действия антибиотики могут быть классифицированы следующим образом:

1. Нарушающие синтез клеточной стенки бактерий.

2. Нарушающие функции мембран.

3. Подавляющие синтез нуклеиновых кислот.

4. Подавляющие синтез белков.

5. Ингибирующие процессы клеточного дыхания.

6. Антиметаболического действия.

7. С иммунокорректирующей активностью.

По спектру действияантибиотики делятся на такие группы:

1. Противобактериальные узкого спектра действия, активные в отношении грамположительных бактерий.

2. Противобактериальные широкого спектра действия.

3. Противотуберкулезные.

4. Противогрибковые.

5. Противоопухолевые.

6. Антипротозойные.

По химической структуре выделяют 11 групп (или семейств).

Занятие 2. Практическое применение антибиотиков

При слове «антибиотики» всегда на первое место выступало их использование в качестве лечебных препаратов при заболевании человека. Но не менее значимо применение антибиотиков в сельском хозяйстве, пищевой и консервной промышленности. При выборе антибиотика для борьбы с возбудителями заболевания и очагом его распространения, а также способа применения препарата основное внимание обращают не только на биологический эффект, но и на экономический и экологический аспекты. Одно из существенных требований к антибиотикам для сельского хозяйства – они не должны использоваться в медицинской практике.

Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленностиотносятся к 1943 году. Применение антибиотиков при консервировании позволяет значительно снизить время термической обработки того или иного продукта. Антибиотик, используемый в этом процессе, подавляя развития ряда бактерий не должен оказывать токсического действия на организм человека.

Модуль 2: Выделение и условия культивирования продуцентов антибиотических веществ

Занятие 3. Лабораторное культивирование микроорганизмов – продуцентов антибиотических веществ

Продуценты антибиотиков могут выделяться из самых разнообразных субстратов: почвы, гниющих растительных и животных остатков, илов, воды озер и рек, воздуха и других источников. Наиболее богата микроорганизмами, продуцирующими антибиотики, почва. Из нее большей частью и выделяют организмы — продуценты антибиотических веществ.

Прежде чем начинать поиски продуцентов антибиотических веществ, приступать к выделению микробов-антагонистов, образующих антибиотики, из естественных мест их обитания, исследователь должен иметь ясную цель.

При этом возможны три основные задачи: во-первых, поиски продуцентов уже известных, описанных в литературе и используемых на практике антибиотиков; во-вторых, поиски новых антибиотиков, способных проявлять биологическое действие по отношению к конкретным организмам; в-третьих, обнаружение продуцентов антибиотиков, подавляющих в клетке определенную мишень. В зависимости от поставленной цели должны быть использованы и соответствующие методы поисков организмов — продуцентов тех или иных антибиотических веществ.

На проявление антибиотических свойств микроорганизмов оказывают влияние многие факторы. Какие же факторы оказывают наиболее существенно влияние на образование антибиотиков микроорганизмами при культивировании их в лабораторных условиях. К числу наиболее существенных факторов, оказывающих влияние на проявление антибиотических свойств микроорганизмов, выделенных из природных источников, относятся состав среды, ее активная кислотность, окислительно-восстановительные условия, температура культивирования, методы совместного выращивания двух или большего числа видов микроорганизмов и т.д., иными словами, весь сложный комплекс условий культивирования микроорганизмов. Выяснение характера определенного физиолого-биохимического процесса, осуществляемого микроорганизмом, возможно

только при тщательном подборе соответствующих питательных сред.

Только при учете всех особенностей культивирования организма и при изучении влияния различных компонентов субстрата, физико-химических и физических факторов среды можно определить способность микроорганизма образовывать антибиотическое вещество. Создавая организму разнообразные условия культивирования, тем самым выясняют, какие из них наиболее благоприятны для выявления потенциальных возможностей биосинтеза антибиотиков.

Часто изучаемый антибиотик по тем или иным причинам не может быть использован в медицинской практике, тогда его следует испытать в сельскохозяйственном производстве или в отдельных отраслях пищевой и консервной промышленности. Только после всестороннего и глубокого изучения антибиотика можно говорить о перспективности или, наоборот, о непригодности его для практических целей.

*Лабораторный регламент.* Антибиотическое вещество, имеющее практическую значимость и являющееся новым препаратом, должно выпускаться в промышленных масштабах. Поэтому при изучении продуцента и образуемого им антибиотика в лабораторных условиях разрабатывается так называемый лабораторный регламент. Лабораторный регламент — это технологический документ, которым завершаются научные исследования в лабораторных условиях по разработке метода получения антибиотика. Он служит основой для промышленного регламента. Задача лабораторного регламента — разработка оптимального метода производства антибиотического вещества.

Занятие 4. Основные этапы промышленного получения антибиотиков

После установления лечебных свойств первого антибиотика – пенициллина – сразу же возникла задача организации его массового производства. В настоящее время можно говорить о том, что производство антибиотиков – хорошо развитая отрасль, которая занимает одно из центральных мест в производстве лекарственных препаратов. Огромный спрос на антибиотические препараты со стороны медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности способствовал усиленному поиску новых антибиотиков и получению их в промышленных масштабах.

Современное промышленное получение антибиотиков – это сложная многоступенчатая биотехнологическая система, состоящая из ряда последовательных стадий.

1. Стадия биосинтеза (образования) антибиотика, основной задачей которой является создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика. Высокая результативность этой стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающий подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования организма. Все это входит в понятие управляемый синтез.

2. Стадия предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделения культуральной жидкости от биомассы продуцента), эффективность которой определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, накоплением антибиотика в культуральной жидкости или внеклеточное.

3. Стадия выделения и очистки антибиотика, особенностью которой является достигаемое увеличение концентрации антибиотика (примерно от 1 до 20–30 %). В качестве основных методов используются экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, выпаривание, сушка.

4. Стадия получения готовой продукции, изготовление лекарственных форм, расфасовка, основное требование к которой – высокое качество конечного продукта. Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю: биологическому и фармакологическому. В первом случае ставится задача выяснения стерильности готового препарата, которая обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки препарата. При фармакологическом контроле предполагается исследование токсичности, пирогенности, аллергенности и других свойств препарата, определенных Государственной фармакопеей. Расфасованный и упакованный препарат с указанием биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу. Выход антибиотиков обычно составляет несколько десятков граммов на 1 л.

Можно отметить, что помимо прямой ферментации, существует также способ получения полусинтетических производных антибиотиков. Такое производство было разработано с 1960 года, а первым полусинтетическим антибиотиком явился метициллин. Вообще говоря, на основе ферментативного гидролиза 6-аминопенициллановой (6-АПК) кислоты с помощью фермента пенициллинацилазы, который образуется многими видами микроорганизмов, получено около 40 тыс. полусинтетических производных. 6-АПК оказалась исключительно удобным объектом для введения радикалов вместо атома водорода в аминной группе.

В настоящее время в разных странах созданы биотехнологические производства с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы для выделения 6-АПК из бензилпенициллина. Полученная 6-АПК затем используется для химического синтеза других пенициллинов. Например, при синтезе ампициллина гидролиз бензилпенициллина осуществляют при участии мутанта *Kluivera citrophyla*, после чего вносят клетки *Pseudomonas melanogenium* и эфир D, L-фенилглицина, условия процесса подобраны таким образом, что происходит образование ампициллина (D-аминобензилпенициллин).

Занятие 5. Пути повышения антибиотической продуктивности

Микроорганизмы — продуценты антибиотиков, выделенные из природных субстратов, обычно имеют низкую антибиотическую активность. Так, разные штаммы *Penicillium*, выделенные из почв, образуют пенициллин при глубинном их выращивании в количестве от 10 до 30 ед./мл культуральной жидкости. Продуцент стрептомицина *S. griseus*, впервые выделенный 3. Ваксманом с сотрудниками в 1944 г. из сильно унавоженной почвы, образовывал до 100 мкг/мл стрептомицина.

Понятно, что потребности медицины, сельского хозяйства и некоторых отраслей промышленности не могут быть удовлетворены без получения наиболее продуктивных штаммов организмов, образующих антибиотические вещества.

Поэтому перед наукой была поставлена задача разработать пути повышения биосинтеза практически ценных антибиотических веществ. При решении этой задачи необходимо применять три тесно связанных метода:

1) естественной изменчивости,

2) индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора наиболее активных форм продуцентов антибиотиков,

3) генно-инженерных манипуляций.

Для выделенных штаммов должны быть изучены условия культивирования полученных вариантов в целях определения наиболее оптимальной биосинтетической активности.

Модуль3: Характеристика основных групп антибактериальных препаратов

Занятие 6. Бета-лактамные антибиотики. Пенициллины

В соответствии с классификацией антибиотиков по их химическому строению β-лактамы относятся к семейству антибиотических веществ, включающих в свои структуры производные аминокислот. К β-лактамным антибиотикам относятся соединения, имеющие в своей структуре β-лактамное кольцо. Эти вещества образуются мицелиальными грибами (пенициллины, цефалоспорины, цефемы), стрептомицетами (карбапенемы, клавулановая кислота, цефамицины и др.), некоторыми видами нокардий (монобактамы).

Наряду с антибактериальными свойствами некоторые соединения этой группы (карбапенемы) способны инактивировать β-лактамазы — ферменты бактерий, участвующие в деструкции β-лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов.

По приблизительным подсчетам, из природных источников частичным или полным синтезом получено примерно 10 тыс. соединений, имеющих β-лактамное кольцо. Из этого числа соединений около 50 веществ применяется в клинике.

Бета-лактамные антибиотики находят широкое применение в медицинской практике, так как обладают такими ценными качествами, как надежность, относительно широкий спектр антимикробного действия, высокая активность, стабильность и эффективность. Названные качества дают основания считать эти антибиотики идеальными препаратами для лечения многих бактериальных инфекций.

В настоящее время большое значение имеет так называемый полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина, обладающих рядом ценных свойств. Исходным продуктом в указанном синтезе служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).

Это вещество практически лишено антибиотических свойств, его биологическая активность составляет примерно 0,002 активности бензилпенициллина. Кислоту получают в результате биосинтеза при развитии P. chrysogenum в специфических условиях его культивирования. Впервые на возможность получения 6-АПК в результате изменения условий культивирования гриба указал К. Като (1953). Позже это соединение предложили получать из культуральной жидкости *P. chrysogenum*, выращенного в среде без предшественника. Однако наиболее перспективный способ получения 6-АПК — ферментативный метод гидролиза молекулы бензилпенициллина с участием иммобилизованной пенициллинацилазы.

Наиболее широко в медицинской практике применяются полусинтетические пенициллины, полученные на основе 6-амино- пенициллановой кислоты.

6-аминопенициллановую кислоту подвергают химическому ацилированию и получают соответствующие аналоги пенициллина, обладающие иными свойствами, чем природные пенициллины. В результате удалось получить около 50 тыс. полусинтетических пенициллинов, из них около 35 антибиотиков применяются в клинике. Наиболее ценные полусинтетические препараты полученные в результате химической модификации природного антибиотика это: амоксициллин, ампициллин,

диклоксациллин, карбенициллин, метициллин, нафциллин, оксациллин.

Из общего количества природного пенициллина, выпускаемого промышленностью (около 17 тыс. т), примерно 35% используется непосредственно в медицинской практике, а около 65% идет на получение 6-аминопенициллановой кислоты.

Все известные пенициллины подобно бензилпенициллину подавляют синтез клеточной стенки бактерий.

Большим достижением последних лет в создании полусинтетических пенициллинов следует считать получение ациламинопенициллинов (азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин) — пенициллинов 2-го поколения, которые более эффективны в отношении определенных штаммов энтеробактерий и псевдомонад, чем ампициллин и карбенициллин.

Задачей получения новых пенициллинов является разработка препаратов, более устойчивых к β-лактамазам, со сниженной способностью к индуцированию синтеза β-лактамаз, обладающих пролонгированным действием.

Пенициллин — наиболее ценное и мощное из известных средств для лечения заболеваний, вызываемых кокками и некоторыми анаэробными палочками. Преимущество пенициллина состоит в том, что этот препарат — один из наименее токсичных антибиотиков, используемых в медицинской практике. Достаточно указать, что из 4200 больных, получавших пенициллин, только у семи человек отмечены клинически выраженные токсические реакции: температурная реакция у четырех больных, некроток-

сические реакции со стороны центральной нервной системы у двух больных и местная реакция со стороны слизистой оболочки полости рта у одного больного. Вместе с тем в последние годы наблюдаются случаи аллергических реакций больных на повторное применение пенициллина или его производных. Крайнее проявление аллергии — анафилактический шок после внутримышечного введения пенициллина, иногда заканчивающийся смертью.

Во избежание подобных явлений больным перед введением пенициллина необходимо делать накожные пробы для выяснения возможной чувствительности к антибиотику. Высокие лечебные свойства и чрезвычайно низкая токсичность способствовали широкому применению пенициллина в медицине. Одним из первых заболеваний, при котором стали применять этот антибиотик, был сепсис (общая гнойная инфекция). Сепсис чаще всего вызывается стафилококками, стрептококками, а иногда и пневмококками. До открытия пенициллина в 90% случаев септические заболевания кончались летально. В настоящее время процент смертности от сепсиса резко сокращен.

Пенициллин широко применяется в хирургии, успешно используется при лечении остеомиелитов (особенно острых остеомиелитов), карбункулов, инфицированных ран и других заболеваний. Использование пенициллина создало широкие возможности для лечения таких заболеваний, как перитонит и пневмония.

В педиатрической практике пенициллин имеет большое значение при лечении гнойных осложнений после скарлатины (острые лимфадениты, отиты и др.).

Пенициллинотерапия занимает важное место в лечении сифилиса (особенно его ранних форм), который в последнее десятилетие получил очень широкое распространение. С начала 80-х гг., как отмечают И.И. Мавров, М.Н. Бухаров и др. 1989), в мире ежегодно регистрируется 50 млн свежих случаев сифилиса.

Чаще бензилпенициллин применяют внутримышечно, так как при употреблении его в виде таблеток он разрушается под действием желудочного сока.

Применение кислотоустойчивого типа пенициллина — фено-ксиметилпенициллина — позволяет использовать антибиотик в виде таблеток, что имеет большое значение при лечении детей. В зависимости от характера заболевания суточная доза антибиотика составляет от 200 000 до 1 000 000 ед.

Наиболее широкое применение в медицинской практике находят полусинтетические пенициллины, полученные на основе 6-аминопенициллановой кислоты.

Занятие 7. Бета-лактамные антибиотики. Цефалоспорины

По химическому строению антибиотики принадлежат к группе β-лактамных соединений, близких к пенициллинам, в биосинтезе основного (цефемового) ядра которых участвуют две аминокислоты: L-цистеин и L-валин.

Цефалоспорины — антибиотики, образуемые грибами из рода *Cephalosporium*. Основной продуцент этих антибиотиков — гриб *С. acremonium*, позднее переименованный в *Acremonium chrysogenum*, был выделен в 1945 г.

Впервые сообщение о цефалоспорине было сделано в 1948 г. Джузеппе Бротцу. В культуральной жидкости гриба он обнаружил три варианта цефалоспорина: Р, N и С. Цефалоспорин С — главный антибиотик, на основе которого впоследствии были созданы многочисленные полусинтетические препараты с весьма ценными свойствами.

По биологическим свойствам эти антибиотики несколько отличаются от пенициллина. Цефалоспорины подавляют развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но антибиотическая активность их гораздо ниже, чем у пенициллина.

Подобно пенициллину, цефалоспорины содержат β-лактамное кольцо. Имеется аналогичный пенициллину фермент, катализирующий гидролиз β-лактамного кольца цефалоспорина С, — цефалоспориназа.

Методом смешанного (биологического и химического) синтеза получено большое число (более 30 тыс.) аналогов цефалоспорина с весьма разнообразными спектрами биологического действия. Многие из этих соединений имеют важное практическое (клиническое) значение.

На основе 7-аминоцефалоспорановой и 7-аминодеацетокси- цефалоспорановой кислот удается получить большое число по- лусинтетических антибиотиков, широко применяющихся в медицинской практике.

Первые полусинтетические цефалоспорины (цефалоридин и цефалотин) были синтезированы в 60-х гг. Позднее были получены полусинтетические цефамицины (цефотетан, цефокситин и др.). К настоящему времени полусинтетических цефалоспоринов насчитывается уже более 30 тыс. Около 100 из них внедрены в медицинскую практику или проходят клинические и доклинические испытания. Эти препараты имеют различную антимикробную активность, отличаются стабильностью к действию β-лактамаз и эффективностью при лечении тех или иных заболеваний. В зависимости от названных свойств и времени их получения цефалоспорины подразделяют на четыре поколения.

Цефалоспорины I поколения – цефалоридин, цефалотин, цефазолин, цефалексин и др. Цефалоспорины II поколения – цефамандол, цефокситин, цефуроксим и др. Цефалоспорины III поколения – цефотаксим, цефаклор, цефтазидим, цефтриаксон, цефтизоксим, цефоперазон, цефпирамид и ряд других. Цефалоспорины IV поколения – цефпиром, цефепим и др.

Занятие 8. Полиены – противогрибковые соединения

В настоящее время из всего многообразия противогрибковых препаратов только 6 препаратов – истинные антибиотики. Остальные являются химиотерапевтическими препаратами (табл. 1).

Основная масса противогрибковых антибиотиков относится к группе полиенов. Особенностью их строения является наличие в макроциклическом лактонном кольце сопряженных двойных связей. К полиенам относятся нистатин, амфотерицин В, микогептин, леворин, натамицин.

Таблица 1 – Классификация современных противогрибковых средств

|  |  |
| --- | --- |
| Химическая группа | Препараты |
| Антибиотики | |
| Ароматические антибиотики  Макроциклические лактоны - полиены | гризеофульвин  нистатин  амфотерицин В  микогептин  леворин  натамицин |
| Химиотерапевтические препараты | |
| Группа азолов:  аллиламины  тиокарбаматы  производные морфолина  галогенизированные фенолы | производные имидазола  7 препаратов  производные триазола  3 препарата  3 препарата  2 препарата  2 препарата  4 препарата |

К группе ароматических антибиотиков, структура которых имеет конденсированные ароматические соединения относится противогрибковый препарат гризеофульвин. Гризеофульвин относится к группе ароматических соединений, представляющих собой конденсированные ароматические компоненты. Антибиотик образуют плесневые грибы из рода *Penicillium* (*P. griseоfulvum, P. nigricans, P. raistrichi* и др.). Антибиотик обладает высокой биологической активностью в отношении грибов, имеющих хитиновую оболочку (табл. 2), вызывая у них ненормальный рост с характерным закручиванием.

Таблица 2 – Антимикробный спектр гризеофульвина

|  |  |
| --- | --- |
| Грибы | Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл |
| Microsporum canis  М. audouinii  Epidermophyton floccosum  Trichophyton rubrum  Другие патогенные грибы | 0,22-0,24  0,40-0,46  0,38-0,42  0,14-0,18  25-30 |

Гризеофульвин — малотоксичный препарат. Антибиотик оказался хорошим средством против трихофитии (стригущего лишая), вызываемого грибом *Trichophyton rubrum*. Он проявляет положительное действие и при лечении ряда других кожных заболеваний и болезней ногтей. Этот антибиотик — эффективный препарат для борьбы с мучнистой росой клубники, огурцов, с возбудителем увядания цитрусовых, он проявляет биологическое действие против возбудителя килы капусты. В связи с широким применением гризеофульвина на практике интерес к нему за последнее время значительно возрос.

Занятие 9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Для выбора средств эффективной антимикробной терапии и профилактики важно определять чувствительность выделенных культур возбудителей к антимикробным препаратам. С этой целью применяют несколько методов исследования: диско-диффузионный, метод серийных разведений, метод Е-тестов, пограничных концентраций и другие. Нередко в качестве эпидемического маркера используют резистограмму штаммов — данные по их устойчивости/чувствительности к химиопрепаратам, что позволяет оценивать идентичность штаммов, выделенных из разных источников.

При использовании антибиотиков на практике важно определять чувствительность к ним клинически значимых штаммов микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам (ХТП) необходимо определять в каждом случае инфекции и периодически — в ходе лечения. Главным показателем чувствительности является минимальная ингибирующая концентрация — МИК (мкг/мл), т. е. минимальная концентрация антибиотика, задерживающая рост микроба-возбудителя в стандартном опыте. Значение

величины МИК определяют методом серийных разведений или методом диффузии в агар (дисками или Е-тестами). В любом случае критерием чувствительности является значение величины терапевтического индекса

Т = МИК/К,

где К — концентрация данного антибиотика (мкг/мл) в очаге инфекции (или в крови) при введении терапевтических доз препарата.

Микроб чувствителен, а антибиотик обычно клинически эффективен при Т < 0,3. Значения К можно найти в специальных таблицах.

На практике величина МИК позволяет отнести испытуемый штамм микроорганизма к одной из трех категорий: чувствительный, умеренно устойчивый, устойчивый.

Микроорганизм считают чувствительным, если у него нет механизмов резистентности к данному антимикробному средству и при лечении стандартными дозами инфекции, вызванной данным микроорганизмом, отмечается хорошая терапевтическая эффективность.

Устойчивым к антимикробному средству считают микроорганизм, если он имеет механизмы резистентности к данному препарату и при лечении инфекций, вызванных этим микроорганизмом, нет клинического эффекта даже при использовании максимальных терапевтических доз этого препарата.

Микроорганизм относят к умеренно устойчивым, если по своей чувствительности он занимает промежуточное значение между чувствительными и устойчивыми штаммами. При лечении инфекций, вызванных данным возбудителем, хорошая клиническая эффективность наблюдается только при использовании высоких терапевтических доз препарата (или при локализации процесса в местах концентрации антимикробного средства, например в моче при мочевых инфекциях).

Занятие 10. Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков

При воздействии ряда антибиотиков на чувствительные к ним микроорганизмы нередко возникают формы, устойчивые к их действию. Особенно быстрая адаптация наблюдается под влиянием стрептомицина и пенициллина. Например, для повышения устойчивости к стрептомицину у *Envinia carotovora* в 1000 раз (с 0,25 до 250 мкг/мл) потребовалось всего 16 пассажей, а для повышения устойчивости *Xanthomonas vesicatoria* в 3125 раз необходимо 22 пассажа в средах с постепенно возрастающими концентрациями антибиотика.

В связи с широким использованием антибиотиков в различных сферах практической деятельности решение проблемы возникновения устойчивых форм микробов имеет важное значение. Резистентность микроорганизмов проявляется не только к антибиотикам, но и к химически синтезированным лечебным препаратам. Так, в связи с широким и активным применением в лечебной практике фторхинолонов наблюдается появление и распространение устойчивых к ним микроорганизмов. При этом необходимо подчеркнуть, что чем активнее применяются антибиотики в качестве химиотерапевтических веществ, тем больше возникает устойчивых к ним форм бактерий. Так, если в первый период применения пенициллина обнаружено около 8% резистентных форм *Staphylococcus aureus*, то к концу 1950 г., т.е. меньше чем через десять лет, их число возросло до 70%. Глобальный характер проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам приобрела в конце 80-х — начале 90-х гг. XX столетия. Многие развитые страны начали разрабатывать и осуществлять на практике национальные программы по сдерживанию возникновения и распространения резистентных форм микроорганизмов.

Теоретический смысл изучения факторов приспособления микроорганизмов к антибиотикам определяется необходимостью выявления механизма этого явления, вскрытия причин адаптации микроорганизмов к новым условиям существования.

Практическое значение проблемы адаптации микробов к действию антибиотиков обусловлено тем, что появление резистентных форм in vivo при применении антибиотиков в лечебной практике или в борьбе с фитопатогенными организмами может привести и приводит к существенному снижению лечебных свойств антибиотиков. Поэтому применение антибиотиков в клинике и особенно выбор того или иного препарата для назначения больному должны учитывать его эффективность в отношении возбудителя заболевания и индивидуальные особенности больного.

Высказываются различные точки зрения на возможность появления устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов. Разнообразие взглядов на феномен резистентности микроорганизмов к антибиотикам и его все возрастающее значение при практическом использовании этих биологически активных веществ требует более подробно рассмотреть все имеющиеся сведения о причинах (механизмах) устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Можно указать на следующие основные факторы, приводящие к устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

1. Состояние клеточной стенки, при котором антибиотик задерживается на поверхности клетки и не проникает внутрь в результате ухудшения проницаемости антибиотиков через пориновые каналы внешней мембраны или по другим причинам.

2. Способность клетки разрушать лекарственный препарат раньше, чем он сможет проявить биологическое действие, посредством конститутивных либо индуцируемых ферментов, усиленно синтезируемых клеткой в присутствии антибиотика, или модифицировать антибиотик.

3. Изменение клеточных структур (рибосом, мембран и др.) или модификация активных центров антибиотика, находящегося в клетке, под действием ряда факторов.

4. Способность бактерий снижать концентрацию антибиотика внутри клетки в результате активного выноса антибиотика.

5. Нарушение в микробной клетке мишени, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику.

6. Перенос генов антибиотикорезистентности от устойчивых штаммов микроорганизмов к чувствительным.

В медицинской практике в целях сдерживания процесса воз- никновения форм микроорганизмов, устойчивых к используемым антибиотикам, наметились следующие основные пути.

1. Резкое сокращение использования антибиотиков в качестве профилактических средств и запрещение свободной (без рецепта врача) продажи антибиотических препаратов.

2. Исключение из практики применения в течение многих лет одних и тех же антибиотиков и периодическая замена антибиотиков с возвратом к старым препаратам через 10-15 лет, а также применение антибиотиков при лечении больного не более пяти суток.

3. Повышение лечебных доз антибиотика. Однако это необходимо делать очень осторожно. Для создания в очаге поражения высоких концентраций антибиотиков их вводят непосредственно в эти очаги (внутриплеврально, внутрисуставно, внутричерепно, внутрисосудисто и т.п.).

4. Применение антибиотиков в сочетании с другими препаратами, например, сульфаниламидами, нитрофуранами, гормонами, а также с некоторыми другими биологически активными веществами (продигиозаном, лизоцимом, γ-глобулином и др.) способствует повышению их физиологического действия.

5. Применение иммобилизованных на определенных носителях или инкапсулированных в липосомы антибиотиков. Липосомальные формы антибиотиков. Соответствующим методом получают липосомы. Липосомы — это замкнутые би- или многослойные липидные везикулы (размером от 25-40 до 100 нм и более), близкие по некоторым характеристикам к природным биологическим мембранам. Они не токсичны и не дают побочных реакций. Для образования липосом обычно используют лецитин (фосфатидилхолин) и холестерин в соотношении 1:1. Липосомы могут формироваться и из других липидных и дополнительных компонентов.

В липосомы инкапсулируют те или иные антибиотики. Высокая степень инкапсулирования характерна для таких антибиотиков, как β-лактамы, аминогликозиды, антрациклины, фузидин и др.

Применение антибиотиков в смеси с полимерами или получение модификаций антибиотических веществ в результате химического присоединения их к полимерным материалам (это, по существу, использование иммобилизованных антибиотиков) также способствует пролонгации биологического действия антибиотиков в организме человека, уменьшению их токсичности, улучшению растворимости, повышению устойчивости к действию ферментов. Эффект пролонгирующего действия полимера на антибиотик зависит как от молекулярной массы полимера, так и от химической природы антибиотического вещества.

6. Применение ингибиторов ферментов, инактивирующих используемые антибиотики. Применение ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики, — один из методов борьбы с устойчивыми к антибиотикам формами микроорганизмов. На практике широко применяются ингибиторы β-лактамаз (клавуланованя кислота, сульбактам) совместно с антибиотиками, относящимися к группе β-лактамов.

Так, эффективно используется в медицинской практике препарат аугментин, состоящий из ампициллина и клавулановой кислоты. Он применяется в лечебной практике с 1987 г., и по антибактериальной активности превосходит многие антибиотики широкого спектра действия.

Амоксиклав — препарат, состоящий из амоксициллина и клавулановой кислоты. Используется для лечения заболевания, возбудителем которого являются полимикробные, в том числе смешанные аэробные и анаэробные инфекции. Препарат препятствует возникновению резистентных форм. Механизм ингибирования β-лактамазы клавулановой кислотой связан со способностью последней проникать в активный центр фермента. При этом происходит реакция ацилирования молекулы лактамазы

Другим примером комбинированного препарата является уназин, в состав которого входят две части ампициллина и одна часть сульбактама. Этот препарат так же, широко применяется в клинике. Сульбактам, входящий в уназин, имеет β-лактамную структуру, но практически не обладает антибактериальной активностью. Однако он является ингибитором β-лактамаз.

Итак, при оценке спектра действия того или иного антибиотика следует учитывать наличие или отсутствие защитных механизмов в клетках микроорганизмов. В настоящее время к основным защитным механизмам относят: 1) модификацию молекул-мишеней действия антибиотика; 2) продукцию ферментов, инактивирующих антибиотик; 3) наличие систем активного выброса антибиотика из клетки.

Различают природную и приобретенную устойчивость к антибиотикам. При природнойустойчивости у микроорганизмов отсутствует мишень для действия препарата.

Под приобретеннойустойчивостью понимают возникновение в пределах штамма клеток микроорганизмов с существенно более высокими значениями МИК антибиотика для них, чем для популяции в целом.

Клиническая устойчивостьштаммов заключается в неэффективности

и невозможности лечения инфекционного заболевания данным антибиотиком, хотя микроорганизм-возбудитель и обладает мишенями для его действия. В этом случае в организме не может быть достигнута такая концентрация препарата, при которой происходит подавление роста микробных клеток.

Модуль 4: Характер и механизм биологического действия антибиотиков

Занятие 11. Антибиотики – ингибиторы функционирован6ия клеточной мембраны

Все антибиотики, действующие на клеточную мембрану, могут вызывать нарушение осмотических свойств клетки, не являясь при этом высокоспецифичными. Зачастую они относятся к токсичным соединениям и в силу этого применяются местно. Антибиотики этой группы могут быть классифицированы следующим образом:

1) вещества, нарушающие надмолекулярную структуру и организацию клеточной мембраны, что приводит к высвобождению клеточных веществ.

К веществам этой группы, нарушающим структуру мембраны, относят соединения двух типов в химическом отношении. Это антибиотики, которые имеют пептидное кольцо, состоящее менее чем из 10 аминокислот, но к этому кольцу присоединяется пептидная цепь, а к ней –разветвленная жирная кислота (8–9 атомов углерода). Их примером являются полимиксины. Активны данные соединения в отношении грамотрицательных бактерий.

2) вещества-ионофоры, участвующие в транспорте катионов и анионов. Они могут быть подразделены:

а) на каналообразователи (образуют в мембране канал для определенных веществ);

б) подвижные переносчики, проходящие с ионом через мембрану, или подвижные ионофоры.

Группу ионофорных антибиотиковсоставляют несколько различных в химическом отношении соединений, общим для них является то, что они способны облегчать перенос через мембраны различных неорганических катионов. Эти соединения не нашли широкого применения в лечебной практике в силу неспецифического действия и токсичности, однако они используются в научных исследованиях как инструмент для определения функций мембран. Типичный представитель таких антибиотиков – валиномицин. По сходному механизму работает и антибиотик нонактин, относящийся к группе макротетралидов. Антибиотикам с линейной структурой – монензину и нигерицину – также присуща способность транспортировать катионы калия и натрия соответственно. Монензин имеет важное практическое значение, так как является средством, предотвращающим развитие кокцидиоза у кур. При его использовании устойчивые формы появляются относительно редко, а пищеварение улучшается.

К антибиотикам-ионофорам, образующим в мембране поры, относится грамицидин А. С и тироцидины. Они являются циклическими полипептидами, состоящими из 10 аминокислот и имеющими свободные аминогруппы, активны в отношении грамположительных бактерий.

Также относятся к антибиотикам-ионофорам, образующим в мембране пор, антибиотики-полиеныиз группы макролидных. Особенностью полиеновых антибиотиков является то, что они действуют только на мембраны со стеролами.

К числу антибиотиков, нарушающих поступление катионов в клетку, относят и сидеромицины, механизм действия которых связан с особенностями поступления железа в клетки бактерий. Считают, что сидеромицины конкурируют с сидерофорами и, следовательно, подавляют поступление железа в клетку.

Занятие 12. Антибиотики, ингибирующие процессы образования клеточной стенки бактерий

В данную группу могут быть объединены соединения, препятствующие биосинтезу клеточной стенки на различных этапах. В общем виде можно выделить три группы таких соединений:

1) ингибиторы образования компонентов, из которых строится клеточная стенка;

2) ингибиторы реакций переноса структурных блоков клеточной стенки из цитоплазмы наружу;

3) ингибиторы образования связей (сшивок) между элементами пептидогликана.

Общими свойствами антибиотиков, относящихся к данным группам, можно считать бактерицидный эффект при их действии; эффективное воздействие только на делящиеся клетки, а также устойчивость к ним бактерий без клеточной стенки.

К антибиотикам, ингибирующим образование предшественников, относят фосфомицин и D-циклосерин. Антибиотик фосфомицин взаимодействует с ферментом, участвующим в образовании N-ацетилмурамовой кислоты, связанной с уридиндифосфатом, действуя как аналог ФЕП (фосфоенолпирувата) и связывается с цистеином в активном центре трансферазы. Мишень для действия антибиотика находится в цитоплазме, и реакция является весьма специфичной: на другие ферменты и реакции с участием ФЕП антибиотик не действует. D-циклосеринследует рассматривать как антагониста D-аланина, что обусловлено их структурным сходством.

Бацитрацин Аотносится к антибиотикам, связывающимся с молекулами-переносчиками. Этот пептидный антибиотик обладает повышенной токсичностью для организма за счет возможного связывания со стеролами мембран и используется местно для подавления грамположительной микрофлоры. Антибиотик подавляет перенос через мембрану мурамилпентапептида к растущей цепи пептидогликана

К антибиотикам третьей группы (препятствующим образованию сшивок на поверхности мембраны) относят соединения двух больших групп - гликопептидные и β-лактамные. Гликопептидные антибиотики ванкомицин и тейкопланин являются бактерицидными, используются для лечения тяжелых кокковых инфекций.

β-лактамныеантибиотики являются, пожалуй, самыми широко распространенными в лечебной практике. Они используются для лечения ряда заболеваний и активны в отношении многих возбудителей, так как обладают широким спектром антимикробного действия, высокой активностью, стабильностью и эффективностью.

Общим свойством антибиотиков данной группы является наличие в молекуле β-лактамного кольца, а в биологическом смысле – механизм антимикробного действия. В лечебной практике используется около 50 различных препаратов группы пенициллинов.

Все β-лактамные антибиотики являются бактерицидными. Между собой они различаются по способности всасываться, используемым дозам, фармакокинетическим показателям, способам применения и т. д.

Еще в 1960-х годах (на модельной системе *Staphylococcus aureus*) было показано, что мишенью действия пенициллинаявляются ферменты, обеспечивающие образование клеточной стенки бактерий. Единственной приемлемой стала гипотеза о сходстве между молекулой фермента транс-пептидазы и молекулой пенициллина. Вероятно, пенициллин связывается с активным центром фермента транспептидазы, ацилирует его и блокирует доступ для субстрата. Высвобождение молекулы пенициллина из комплекса происходит крайне медленно, в то время как природный субстрат (пентапептид) высвобождается быстро. Установлено сходство между пространственной ориентацией атомов и полярных групп пенициллинового ядра и одной из конформаций остатков D-аланина-D-аланина, причем такое сходство устанавливается при взаимодействии с ферментом. β-Лактамные антибиотики действуют и на карбоксипептидазы, удаляющие свободные остатки D-аланина, однако такое действие не является для клетки летальным.

Рассматривая действие β-лактамных антибиотиков на клеточную стенку, а также анализируя возможные механизмы устойчивости к ним, следует отметить и роль так называемых пенициллинсвязывающих белков

(ПСБ, PBP”s). Открыты эти белки были собственно по способности связываться с меченым пенициллином, а также конъюгатами пенициллина и

сывороточных белков. ПСБ локализованы в цитоплазматической мембране, по своей активности относятся к ферментам классов транспептидаз и D-аланинкарбоксипептидаз. Основная их роль – участие в процессах синтеза клеточной стенки, формообразовательных процессах в клетке и ее физиологическом цикле. Разные типы ферментов включены в увеличение длины, приобретение формы, образование перегородки клетки. Считается, что типов ПСБ меньше у кокков, нежели у палочек ПСБ доступны для антибиотика, так как они располагаются частично в мембране, частично – в периплазме грамотрицательных бактерий или на границе мембрана – среда.

Одно из требований, которое предъявляется к таким препаратам, – улучшенная проницаемость через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. К немаловажным свойствам можно отнести и повышение связывания с ПСБ. Наконец, некоторые фармакокинетические показатели: незначительное связывание с белками сыворотки крови, меньшая аллергенность, стабильность в кислой среде желудка, всасываемость при приеме внутрь – относятся также к существенным при оценке качества вновь созданных препаратов.

Занятие 13. Антибиотики, ингибирующие процесс биосинтезе белка

Антибиотики, относящиеся к данной группе, весьма многочисленны и подавляют синтез белка за счет различных механизмов и на различных уровнях.

Условно их можно разделить на четыре группы:

1. Ингибиторы активации аминокислот и реакций переноса.

2. Ингибиторы функций малых субъединиц (30S) рибосомы.

3. Ингибиторы функций больших субъединиц (50S) рибосомы.

4. Ингибиторы внерибосомных функций.

Особенностями действия антибиотиков данной группы являются

следующие:

1) временная остановка биосинтеза белка сама по себе не является летальной для клетки, поэтому антибиотики – ингибиторы биосинтеза белка обладают бактериостатическим действием, если только не связываются необратимо с какими-либо компонентами системы синтеза;

2) остановка биосинтеза белка имеет различные последствия для клеточного цикла: уже начавшийся цикл репликации ДНК продолжается, но новых циклов не инициируется, синтез РНК также продолжается в течение короткого промежутка времени, скорость синтеза клеточной стенки снижается и в конце концов прекращается;

3) биосинтез белка у про- и эукариот различается, поэтому может подавляться разными антибиотиками.

В качестве представителей антибиотиков первой группы можно рассматривать природные и синтетические аналоги аминокислот, подавляющие образование комплексов «ацилированная аминокислота –тРНК». Связываясь с тРНК, они могут включаться в полипептид, что приводит к образованию аномальных белков. К числу аналогов аминокислот можно отнести этионин, норлейцин, этилглицин, дигидропролин.

Природными соединениями являются боррелидин и индолмицин, которые конкурентно подавляют связывание с аминоацил-тРНК треонина и триптофана соответственно. За исключением индолмицина, который является специфическим ингибитором прокариотической тРНК-синтетазы триптофана, остальные соединения действуют неспецифически и поэтому не нашли использования в клинике.

На стадии взаимодействия с пептидил-тРНК действует пуромицин. Это уникальный ингибитор белкового синтеза, так как он вступает в реакцию образования пептидной связи с С-концевым аминокислотным остатком растущей полипептидной цепи на рибосоме, что приводит к преждевременной терминации образования полипептида. Структурное сходство пуромицина и аминоациладенозина приводит к тому, что аминогруппа антибиотика образует пептидную связь с ацильной группой концевого аминоациладенозина пептидил-тРНК, связанной с рибосомой. Образование стабильного комплекса приводит к завершению образования пептидных связей и высвобождению пептидилпуромицина из рибосомы.

Отмечено структурное сходство пуромицина и концевого аминоациладенозина в тРНК. Аминоациладенозин является концевым участком в тРНК как про-, так и эукариотических клеток, и действие пуромицина распространяется на клетки этих типов.

Процесс биосинтеза белка, а из клеточных структур – рибосомы является мишенью действия аминогликозидных антибиотиков. По своей значимости аминогликозиды занимают после β-лактамных второе место. Первым обнаруженным представителем антибиотиков данной группы явился стрептомицин. Он был открыт в 1944 году С. Ваксманом, за что впоследствии (в 1952 году) ему была присуждена Нобелевская премия.

Относясь к антибиотикам с широким спектром действия, аминогликозиды используются для лечения таких инфекционных заболеваний, как туляремия, чума, коклюш, туберкулез. Стрептомицин может быть использован в сельском хозяйстве для борьбы с заболеваниями растений: бактериальным увяданием фасоли, ожогом косточковых. Антибиотики являются бактерицидными.

На молекулярном уровне действие аминогликозидов происходит следующим образом. Уже достаточно давно установлено, что стрептомицин действует на 30S субъединицу, другие аминогликозиды связываются с обеими субъединицами, в их присутствии образуется нестабильный 70S инициаторный комплекс и обрывается биосинтез белка.

Следовательно, аминогликозидные антибиотики подавляют синтез

белка трехфазным путем:

1) при низких концентрациях (порядка 2 мкг/мл) наблюдается общее подавление синтеза;

2) при более высоких (порядка 50 мкг/мл) синтез белка даже стимулируется;

3) при еще больших концентрациях процесс вновь подавляется.

В первом случае считают, что ошибки считывания незначительны; во втором – ошибки считывания существенны, особенно для терминирующих кодонов, что приводит к синтезу аномально длинных белковых цепей, и это фиксируется как увеличение синтеза белка. Наконец, в третьем – молекулы антибиотика способны связываться и занимать новые места на рибосоме.

Таким образом, можно сказать, что летальное действие аминоглико-зидов обусловлено подавлением диссоциации свободных рибосом; снижением точности трансляции; подавлением транслокации рибосом; подавлением терминации полипептидной цепи.

Аминогликозиды относятся к препаратам с низким терапевтическим индексом, т. е. малым разрывом между терапевтической и токсической дозой или концентрацией. Существует модель, согласно которой в нервной ткани аминогликозиды взаимодействуют с полифосфоинозитидами – компонентами мембран. Это приводит к изменению проницаемости для различных катионов. Ототоксический эффект аминогликозидов (влияние на восьмую пару черепно-мозговых нервов и сопутствующая глухота при длительном применении) связывают с конкуренцией между аминогликозидами и катионами кальция за отрицательно заряженные фосфорные остатки. В некоторых случаях частота ототоксичности наблюдается в пределах 2–25 %. Ототоксический эффект не снимается при прекращении приема антибиотика, а его наличие зависит от индивидуальных особенностей и срока приема антибиотика.

Нефротоксический эффект и нейромышечная блокада (курареподобное действие) обусловлены взаимодействием аминогликозидов с клетками почечных канальцев и с актином. Нефротоксический эффект может сниматься при прекращении приема антибиотиков. Наиболее нефротоксичным является гентамицин. Указанные факты, а также развитие аллергических реакций и высокая частота возникновения резистентных форм, ограничивают использование аминогликозидов в клинике. Ингибитором элонгации белковой цепи является тетрациклин.

К соединениям, блокирующим процессы биосинтеза белка в области 50S субъединицы рибосомотносятсямакролидные антибиотики. С клинической точки зрения данные антибиотики могут быть разделены на противобактериальные и противогрибковые(полиены).

К числу антибиотиков, подавляющих синтез белка относятся: хлорамфеникол (левомицетин), циклогексамид (подавляет петидилтрансферазную активность 50S рибосомальных единиц), эритромицин (связывает 50S субъединицы и ингибирует транслокацию), пуромицин (этот антибиотик – аналог тРНК, подавляет образование петидных связей в процессе биосинтеза белка).

Занятие 14. Антибиотики – ингибиторы репликации и транскрипции ДНК и РНК

Антибиотики, относящиеся к данной группе, могут быть разделены следующим образом:

1) ингибиторы синтеза предшественников нуклеиновых кислот;

2) ингибиторы реакций полимеризации, среди которых:

• ингибиторы матричных функций ДНК;

• ингибиторы ферментов (ДНК-полимераз, РНК-полимераз и др.).

Антибиотики, относящиеся к первой группе, как правило, рассматриваются как потенциальные соединения при терапии опухолей и вирусных инфекций.

Для большинства антибиотиков данной группы механизм действия заключается в ингибировании ферментов на отдельных этапах пути синтеза нуклеотидов. Так, например, азасерин имеет большое сходство с глютамином, и при образовании связи с одним из ферментов пути биосинтеза пуринов ковалентная связь между SH-группой цистеина в молекуле фермента и азасерином более прочна, чем между глютамином и ферментом. По такому же механизму действует и диазооксонорлейцин.

Ингибиторы конкретных реакций не имеют высокой специфичности и по этой причине ингибируют ряд реакций, в которых принимает участие

глютамин. Аналогом аспарагиновой кислоты является хадацидин, который действует на стадии амидирования УМФ, причем его участие в реакции является достаточно специфичным. К веществам – ингибиторам синтеза пуринов относятся синтетические соединения из группы сульфаниламидов, триметоприм, метотрексат. Их действие основано на подавлении синтеза фолиевой кислоты на разных стадиях.

По механизму интеркалирующего взаимодействия с ДНК работают и многие противоопухолевые антибиотики. Такие антибиотики получили название межкаланты. Следует отметить, что чрезвычайно сложно в данном случае выделить только одно воздействие противоопухолевых антибиотиков: как правило, эффект бывает многофункциональным, затрагивающим различные уровни метаболизма клетки. В различных странах к применению разрешены блеомицин, рубомицин (дауномицин), митомицин С, актиномицин D (дактиномицин). В настоящее время выделено около 100 различных актиномицинов, продуцируемых примерно 50 видами актиномицетов. В лечебной практике используются два препарата с очень высокой токсичностью – актиномицин Д и С. Особенностью биологического действия актиномицина Д является то, что он действует на микробные клетки, ингибирует рост нормальных и малигнизированных клеток животных, подавляет рост опухолей. Однако в качестве антибактериального препарата не используется, так как обладает малой токсичностью, а в клетки грамотрицательных бактерий проникает плохо.

Антибиотик рубомицин относится к группе антрациклиновых антибиотиков, содержит в своей структуре антратетрациклиновый хромофор, Антибиотик активен в отношении грамположительных бактерий, грибов, простейших, обладает сильно выраженной антимитотической активностью, вызывает хромосомные аберрации и разрывы в ДНК.

Активность данных антибиотиков, вероятно, связана с нарушением матричной активности ДНК в процессе репликации или транскрипции в результате образования стабильных комплексов антибиотика с ДНК. Считают, что в основе действия на ДНК лежит образование интеркаля-ционных комплексов.

К соединениям *–* ингибиторам активности ферментов, участвующим в репликации и транскрипции ДНК, относятся высокоактивные бактерицидные синтетические химиотерапевтические средства широкого спектра действия, получившие название хинолонов и фторхинолонов.

Отмечая бактерицидный эффект действия, указывают, что хинолоны и фторхинолоны в высоких концентрациях ингибируют биосинтез белка и РНК. В качестве последствий действия антибиотиков всех типов отмечают механизм А *in vitro* (парадоксальный эффект): снижение бактерицидной активности, так как при таких концентрациях подавляется синтез белка и РНК. Такой эффект может быть и при совместном действии с ингибиторами синтеза белка (тетрациклином, хлорамфениколом). Другой механизм действия В – сохранение бактерицидной активности в условиях подавления синтеза белка и РНК. Он показан для некоторых препаратов и, наряду с механизмом А, проявляется или отсутствует в зависимости от вида или штамма бактерий. Наконец, некоторые препараты могут проявлять свое действие в отношении неделящихся клеток, находящихся в буфере (механизм С).

В механизме действия следует учитывать и эффект на клетку суб-бактериостатических концентраций антибиотиков: снижаются адгезивные свойства бактерий, подавляется индукция экзо- и эндотоксинов и ферментов, снижаются вирулентные свойства, повышается чувствительность клеток к фагоцитозу. Лечебные свойства фторхинолонов повышаются в присутствии аминогликозидных антибиотиков, что объясняется общими путями поступления, нарушением ori репликации; антагонистическими являются препараты – ингибиторы биосинтеза белка и РНК; индифферентными – β-лактамные антибиотики.

Следует также отметить, что существуют ингибиторы функционирования и субъединицы В ДНК-гиразы. Это антибиотики новобиоцин и коумермицин.

Антибиотики-анзамициныс химической точки зрения напоминают макролиды, однако образование цикла происходит через амидную группу. Ароматическая часть молекулы представляет собой либо бензольное, либо нафталиновое ядро. В зависимости от того, какой связью соединяются ароматическая и лактамная часть молекулы (через углерод или кислород), выделяют стрептоварицины и рифамицины. Полусинтетические рифамицины получили название *рифампицинов*.

Рифампицин связывается с РНК-полимеразой в соотношении 1:1,при этом значение имеет наличие макроциклического кольца. При известной структуре РНК-полимеразы (2α субъединицы, β, β' и σ-фактор) участок связывания рифампицина находится у β-субъединицы. Антибиотик активен в отношении грамположительных бактерий и микобактерий, через наружную мембрану грамотрицательных проникает плохо. Побочные эффекты от использования антибиотиков незначительны: аллергия, окрашивание тканевых жидкостей в красный цвет, плохое всасывание через желудочно-кишечный тракт.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

*Основная и дополнительная литература, информационные ресурсы*

Основная

1. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / О. К. Поздеев ; под ред. В. И. Покровский. - Изд. 4-е. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 765 с. – 10 экз.
2. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М. : БИНОМ, 2008. – 1080 с. – 1 экз. (на базовой кафедре биотехнологии)
3. [Shlaes D.M. Antibiotics](http://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9057-7/page/1). The Perfect Storm / David M. Shlaes. - Springer Netherlands, 2010. – 110 p. ISBN: 978-90-481-9056-0 (Print) 978-90-481-9057-7 (Online)
4. [Antibiotic Resistance](http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-28951-4/page/1). Series: Handbook of Experimental Pharmacology. – V. 211 /Editors: Anthony R.M. Coates. - Springer Berlin Heidelberg, 2012. – 190 p. ISBN: 978-3-642-28950-7 (Print) 978-3-642-28951-4 (Online)
5. Журнал [Антибиотики и химиотерапия](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7663) (<http://elibrary.ru>) Режим доступа: в читальных залах СФУ.
6. Журнал [Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=8773) (<http://elibrary.ru>) Режим доступа: в читальных залах СФУ.

*Дополнительная*

1. Алешукина, А. В. Медицинская микробиология: учебное пособие / А. В. Алешукина. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2003. - 473 с.
2. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник для вузов / Л. Б. Борисов. - 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Медицинское информационное агентство, 2005. - 734 с.
3. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков . – М. : Академия, 2003 . - 462 с.
4. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник для студентов биологических специальностей университетов / Н.С. Егоров. - 6-е изд. М. : Академия, 2004. – 528 с.
5. Нетрусов, А. И. Общая микробиология: учебник для студентов биологических специальностей университетов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - 3-е изд. М. : Академия, 2009. – 352 с. – 10 экз.
6. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебник для медицинских вузов / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровский. – М. : Гэотар-Медиа, 2002 . - 765 с.
7. Практикум по микробиологии: учебное пособие / М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусов. – М. : Академия, 2005 . - 603 с.
8. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т. 1. / пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. – 656 с.
9. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т. 2. / пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. – 496 с.
10. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии: учебное пособие / Е. З. Теппер, Г. И. Переверзева; под ред. В. К. Шильникова. - 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2004 . - 256 с.
11. Шлегель, Г. Г. История микробиологии = Geschichte der Mikrobiologie: пер. с нем. / Г. Г. Шлегель. - Москва: УРСС, 2002. - 302 с.

*Периодические издания (*[*http://elibrary.ru*](http://elibrary.ru) *)*

1. [Микробиология](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7899)
2. [Прикладная биохимия и микробиология](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7955)

Учебное издание

Сарматова Наталья Ивановна

**Антибиотики**

**Методические указания к практическим занятиям**

Редактор И.О. Фамилия

Корректор И.О.Фамилия

Компьютерная верстка: И.О.Фамилия

Подписано в печать (дата) 2012 г. Формат 60х84/16. (А5)

Бумага офсетная. Печать плоская.

Усл. печ. л. (количество страниц/16). Уч.-изд. л.

Тираж 100 экз. Заказ

Редакционно-издательский отдел

Библиотечно-издательского комплекса

Сибирского федерального университета

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

Тел/факс (391) 244-82-31. E-mail rio@sfu-kras.ru

<http://rio.sfu-kras.ru>

Отпечатано Полиграфическим центром

Библиотечно-издательского комплекса

Сибирского федерального университета

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 82а