

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.13.02 Антибиотики

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	4
1.1 Лекция № 1 Взаимоотношения микроорганизмов в естественных условиях	4
1.2 Лекция № 2 Понятие об антибиотиках	5
1.3 Лекция № 3 Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль.....	6
1.4 Лекция № 4 Антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании.....	7
1.5 Лекция № 5 Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества.....	8
1.6 Лекция № 6 Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия.....	9
1.7 Лекция № 7 Антибиотики, образуемые бактериями.....	11
1.8 Лекция №8-9-10 Антибиотики, образуемые актиномицетами.....	13
1.9 Лекция № 11-12 Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.....	16
1.10 Лекция № 13 Антибиотики, образуемые высшими растениями.....	19
1.11 Лекция № 14 Антибиотики животного происхождения.....	20
1.12 Лекция № 15 Направленный биосинтез антибиотиков.....	22
1.13 Лекция № 16 Характер и механизм биологического действия антибиотиков....	24
1.14 Лекция № 17 Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков.....	26
1.15 Лекция № 18 Пути применения антибиотиков, сдерживающие возникновение устойчивых к ним форм микроорганизмов.....	29
1.16 Лекция № 19 Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков.....	31
1.17 Лекция № 20-21 Основные этапы промышленного получения антибиотиков.....	32
1.18 Лекция № 22 Антибиотики в пищевой промышленности.....	38
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	40
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Понятие об антибиотиках	40
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2-3 Классификация антибиотиков	43
2.3 Лабораторная работа № ЛР-4 Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль.....	46
2.4 Лабораторная работа № ЛР-5-6 Антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании.....	50
2.5 Лабораторная работа № ЛР-7 Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества.....	52

2.6 Лабораторная работа № ЛР-8-9 Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия.....	54
2.7 Лабораторная работа № ЛР-10 Антибиотики, образуемые бактериями.....	57
2.8 Лабораторная работа № ЛР11-13 Антибиотики, образуемые актиномицетами...	60
2.9 Лабораторная работа № ЛР-14 Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.....	64
2.10 Лабораторная работа № ЛР-15 Цефалоспорины и цефамицины.....	65
2.11 Лабораторная работа № ЛР-16 Аллицин.Берберин. Госсипол. Хинин.....	67
2.12 Лабораторная работа № ЛР-17 Лизоцим. Эритрин. Экмолин. Интерферон.....	70
2.13 Лабораторная работа № ЛР-18 Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий.....	72
2.14 Лабораторная работа № ЛР-194 Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов.....	75
2.15 Лабораторная работа № ЛР-20 Антибиотики, нарушающие функции мембран.....	76
2.16 Лабораторная работа № ЛР-21 Антибиотики, подавляющие синтез белка.....	80
2.17 Лабораторная работа № ЛР-22 Антибиотики – ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов. Антибиотики, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот.....	84
2.18 Лабораторная работа № ЛР-23 Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков.....	86
2.19 Лабораторная работа № ЛР-24 Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков.....	94
2.20 Лабораторная работа № ЛР-25 Антибиотики в растениеводстве.....	96
2.21 Лабораторная работа № ЛР-26 Антибиотики в животноводстве.....	100
2.22 Лабораторная работа № ЛР-27 Антибиотики в пищевой промышленности....	102

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1 (2 часа).

Тема: «Взаимоотношения микроорганизмов в естественных условиях»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Взаимоотношения микроорганизмов в естественных условиях
2. Антагонизм в мире микроорганизмов

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Взаимоотношения микроорганизмов в естественных условиях

Факторы, от которых зависят различные типы связей, складывающихся внутри микробиологических сообществ, можно условно объединить в две группы: трофические и метаболические.

Трофическая группа связей у микроорганизмов может быть хорошо прослежена при так называемом метабиозе.

Метабиоз в природе широко распространен. При метабиозе продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляются другими микроорганизмами в качестве питательного материала. Этот процесс наблюдается также при синтрофии. *Синтрофными* называют связи, при которых субстрат используется одновременно несколькими видами микробов.

Метаболическая группа связей характеризуется свойством микроорганизмов образовывать в процессе своей жизнедеятельности разнообразные продукты обмена веществ и выделять их в окружающую среду. В результате этого одни микроорганизмы могут потреблять отдельные продукты метаболизма, а для других организмов такие продукты обмена, как антибиотики, сероводород, пероксид водорода и др., являются ингибиторами роста.

Симбиоз. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов характеризуются тем, что два вида микробов или более при совместном развитии создают для себя взаимовыгодные условия.

Протокооперация, в основе которой лежит принцип совместного использования субстрата.

Комменсализм – мирное сожительство разных видов микроорганизмов.

Мутуализм – совместное сожительство микроорганизмов, не способных существовать раздельно.

Антагонизм – при котором один вид микроорганизмов тем или иным способом угнетает или полностью подавляет рост и развитие других видов.

Паразитизм – форма взаимоотношений, при которой некоторые микробы развиваются за счет веществ тела (клетки) других организмов.

Хищничество состоит в том, что некоторые микробы поглощают клетки других видов микроорганизмов и используют их в качестве питательного материала.

2. Антагонизм в мире микроорганизмов

Антагонизм широко распространен среди различных групп микроорганизмов. Его можно обнаружить у бактерий, грибов, водорослей и других групп. В зависимости от наследственных особенностей, а также различных экологических факторов и условий культивирования микроорганизмы могут проявлять антагонистические свойства по отношению к другим организмам. Это явление широко распространено в природе.

Если использовать главный критерий антагонизма — причину, вызывающую проявление антагонистических свойств организма, то все известные к настоящему времени формы микробного антагонизма можно объединить в две основные группы: «пассивный» и «активный».

Сущность «пассивного» антагонизма состоит в том, что угнетение роста одного вида микроорганизмов другим может происходить только при определенных, иногда крайне ограниченных условиях развития этих организмов. Такие условия обычно наблюдаются при лабораторном культивировании микроорганизмов. В обычных естественных условиях роста подобного проявления антагонизма, как правило, не бывает.

При «активном» антагонизме угнетение роста или полное подавление жизнедеятельности одного вида микробы другим происходит в результате обогащения окружающей среды продуктами обмена, выделяемыми организмами при развитии. Однако при определенных концентрациях этих продуктов метаболизма организмы, их продуцирующие, могут развиваться свободно.

К группе «пассивного» антагонизма следует отнести:

- a) антагонизм, складывающийся при совместном развитии разных видов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах;
- b) насильственный антагонизм.

1. Антагонизм, обусловленный использованием разными организмами, совместно развивающимися, одних и тех же питательных веществ. При этом преимущественное положение в развитии будет у того микроорганизма, скорость роста которого выше скорости роста других организмов, его окружающих.

2. Насильственный антагонизм. Если бактериям, которые в естественных условиях не проявляют никаких признаков антагонизма, создать условия недостатка в среде питательных веществ (азотных или углеродных), то одна из бактерий, обладающая протеолитическими ферментами, в качестве питательного материала может использовать клетки других бактерий, не имеющих этих ферментов. В этом состоит основное свойство насильственного антагонизма.

«Активный» антагонизм. В эту группу следует включить взаимоотношения, обусловленные:

- a) образованием микробами органических кислот, спиртов или других продуктов обмена в результате использования отдельных компонентов субстрата;
- b) выработкой и выделением в окружающую среду антибиотических веществ.

К активному антагонизму следует отнести явления паразитизма и хищничества.

1. Антагонизм, связанный с образованием органических кислот, спиртов или других продуктов обмена в результате использования отдельных компонентов среды. У ряда микроорганизмов способность образовывать те или иные продукты жизнедеятельности в процессе эволюционного развития сопровождается параллельной адаптацией их к относительно высоким концентрациям этих веществ. В результате различные по свойствам и химической природе продукты, образуемые в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, служат им орудием в борьбе за существование, подавляя или тормозя рост конкурентных организмов.

2. Антагонизм, обусловленный образованием антибиотических веществ. Наиболее существенной и наиболее яркой формой антагонизма, широко распространенной в мире микроорганизмов, является образование специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих развитие других видов. Такие вещества получили название антибиотиков.

1. 2 Лекция № 2 (2 часа).

Тема: «Понятие об антибиотиках»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Что такое антибиотики

2. Единицы биологической активности антибиотиков
3. Антибиотическая продуктивность организмов

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Что такое антибиотики

Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, протозоя) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие развитие. По сравнению с некоторыми другими продуктами жизнедеятельности специфичность антибиотиков характеризуется тремя основными признаками.

Во-первых, антибиотики в отличие от органических кислот, спиртов и им подобных соединений, способных также подавлять рост микроорганизмов, обладают высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов. Это означает, что антибиотические вещества даже в очень низких концентрациях проявляют высокий физиологический эффект.

Во-вторых, характерная особенность антибиотических веществ — избирательность их действия. Это означает, что каждый антибиотик проявляет свое биологическое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определенным организмам или группам организмов, не оказывая при этом заметного эффекта на другие формы живых существ.

В-третьих, некоторые антибиотики наряду с антибактериальными свойствами могут проявлять иммуномодуляторное действие или выступать в качестве ингибиторов ферментов, инактивирующих практически значимые антибиотические вещества.

2. Единицы биологической активности антибиотиков

За единицу антибиотической активности принимают минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микroба в единице объема питательной среды. После того как многие антибиотики были получены в химически чистом виде, появилась возможность для ряда из них выразить условные единицы биологической активности в единицах массы.

3. Антибиотическая продуктивность организмов

При изучении условий образования антибиотиков и исследовании влияния различных факторов среды на биосинтез антибиотиков важным критерием оценки их активности служит характеристика антибиотической продуктивности организма.

Антибиотической продуктивностью организма называется количество антибиотика (в мкг или единицах), образованное 1мг сухих клеток (или мицелия) изучаемого организма за определенный промежуток времени (1ч). Антибиотическая продуктивность организма выражается в мкг/(мг·ч) или в ед./(мг·ч).

1. 3 Лекция № 3 (2 часа).

Тема: «Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов
2. Биологическая роль антибиотиков в природе

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов.

Способность микроорганизмов образовывать антибиотические вещества изучается, как правило, в условиях искусственного их культивирования, в лабораторных опытах.

Антибиотические вещества как продукты жизнедеятельности организмов могут образовываться и накапливаться непосредственно в почвах.

Основной фактор инактивации антибиотиков в почве — ее микробиологический состав. Во-первых, микроорганизмы, синтезируя кислые или щелочные продукты, могут инактивировать отдельные антибиотические вещества, образующиеся в почве или попадающие туда извне. Во-вторых, почвенные микробы способны образовывать и выделять ферменты, инактивирующие антибиотики.

2. Биологическая роль антибиотиков в природе

Биосинтез антибиотиков — наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Имеются две противоположные концепции о биологической роли антибиотиков. Первая исходит из того, что образование антибиотиков следует рассматривать как специфическую особенность обмена веществ организмов, возникшую и закрепленную у них в процессе эволюционного развития. Образование и выделение антибиотиков в окружающую среду при жизни организмов или после их отмирания — могущественный фактор в борьбе за существование видов. Образование антибиотиков обусловлено определенным характером обмена веществ, контролируемого соответствующими генами, возникшим и закрепленным в процессе эволюции организма.

Антибиотики могут образовываться и образуются при развитии микроорганизмов в естественных местах их обитания (почва) без внесения туда дополнительных питательных веществ. В зависимости от химического строения образовавшиеся в почве антибиотики способны сохраняться там определенное время и проявлять свое биологическое действие.

1. 4 Лекция № 4 (2 часа).

Тема: «Антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании.

2. Источники минерального питания

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании

Среды для культивирования микроорганизмов. Качественная характеристика компонентов среды. Источники азота. Источники углерода. Количественное соотношение источников углерода и азота в среде.

2. Источники минерального питания

Макроэлементы и их значение в жизнедеятельности микроорганизмов. Микроэлементы и их физиологическая роль. Роль галогенов и воды в жизнедеятельности микроорганизмов. Влияние pH среды. Температура. Аэрация. О двухфазном характере развития продуцентов ряда антибиотиков. Образование антибиотиков иммобилизованными клетками микроорганизмов.

1. 5 Лекция № 5 (2 часа).

Тема: «Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Роль антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов
2. Основные механизмы защиты продуцента от действия собственных антибиотиков

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Роль антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов

Изучение роли антибиотиков в жизнедеятельности организмов, их продуцирующих, имеет большое общебиологическое значение. Выяснение вопроса о взаимоотношении продуцента и образуемого им антибиотика может также помочь раскрыть некоторые стороны биосинтеза этих веществ и выяснить механизм их биологического действия.

В процессе развития организмы приспособились к действию антибиотических веществ в тех концентрациях, в которых они их вырабатывают, но если концентрацию антибиотика в среде искусственно увеличить, то микроорганизм, образующий данный антибиотик, начинает реагировать на это.

Итак, микроорганизмы — продуценты антибиотиков выработали определенные механизмы собственной защиты от этих мощных биологически активных соединений, которая у разных продуцентов осуществляется по-разному.

2. Основные механизмы защиты продуцента от действия собственных антибиотиков.

Во-первых, клетки микроорганизмов — продуцентов некоторых антибиотиков могут вырабатывать ферменты, инактивирующие собственные антибиотические вещества. Такой механизм имеется у продуцентов аминогликозидов, макролидов, грамицидина С, хлорамфеникола, полимиксинов и некоторых других. Во-вторых, микроорганизмы могут защитить себя от собственных антибиотиков в результате образования определенных метаболитов, которые способны инактивировать синтезированные антибиотики. Так, выработка цистеина может выполнить эту функцию по отношению к стрептомицину, пенициллину, глиотоксину. В-третьих, микроорганизмы активно выводят из клеток образуемый ими антибиотик, препятствуя его обратному проникновению в клетки. Однако если часть антибиотика все же попадет в клетку, то он может там инактивироваться в результате, например, фосфорилирования. Такой процесс обнаружен у продуцента неомицина. В-четвертых, микроорганизмы могут защитить себя от действия образуемого ими антибиотика в результате того, что в процессе биосинтеза антибиотик скапливается в особых клеточных образованиях («цистернах»), а затем выводится из клетки. Указанный путь характерен для продуцентов эритромицина, хлортетрациклина, виомицина, пенициллина и некоторых других.

В-пятых, продуценты антибиотиков могут быть резистентными по отношению к действию собственных антибиотических веществ в результате изменения

мишени или инактивации антибиотика посредством модификации его молекулы. Такие механизмы обнаружены у стрептомицетов, вырабатывающих актиномицины, макролиды и некоторые другие антибиотики.

В-шестых, устойчивость многих продуцентов антибиотических веществ к образуемым ими антибиотикам связана с наличием у них генов устойчивости. Это имеет место у продуцентов аминогликозидных антибиотиков, актиномицинов, макролидов и др. У ряда стрептомицетов структурные гены биосинтеза антибиотиков (их число варьирует от 10 до 30) и гены устойчивости к ним в составе хромосомной ДНК, как правило, располагаются в одном кластере.

В-седьмых, устойчивость стрептомицетов, вырабатывающих, например, актиномицины, к собственным антибиотикам может проявляться также в результате изменения транскрипции под влиянием антибиотика и наличия в клетках продуцента актиномицинсвязывающих белков.

Таким образом, продуценты антибиотических веществ в процессе эволюции выработали механизмы защиты от действия образуемых ими мощных биологически активных продуктов жизнедеятельности. Вместе с тем антибиотики, находясь в клетках продуцента или вне их, могут оказывать определенное воздействие на процессы метаболизма собственного продуцента.

1. 6 Лекция № 6 (2 часа).

Тема: «Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Основные методы выделения микробов-продуцентов антибиотиков
2. Методы идентификации микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Основные методы выделения микробов-продуцентов антибиотиков

Высев почвенной взвеси в воде на поверхность агаровой пластиинки. Определенную навеску почвы, тщательно растертую в ступке с небольшим объемом воды, количественно переносят в колбу со стерильной водой. Содержимое колбы встряхивают в течение 5 мин, а затем из водной суспензии делают ряд последовательных разведений, которые высеваются на соответствующую агаризованную среду. В дальнейшем для получения чистых культур отдельные колонии после инкубации в термостате при нужной температуре пересевают в пробирки со скоженным питательным агаром. Каждую чистую культуру микроорганизма пересевают на различные по составу среды и после достаточно хорошего развития проверяют ее антибиотические свойства.

Высев почвы на питательный агар, предварительно засеянный тест-организмом. Поверхность питательного агара засевают тест-культурой необходимого организма, после чего на агаровую пластиинку раскладывают небольшие (не более просняного зерна) комочки почвы или же почву наносят в виде пыли, распределяя ее по всей поверхности пластиинки. Затем чашки помещают в термостат и через определенный промежуток времени (24-48 ч, а иногда и более) просматривают кусочки почвы или отдельные ее участки, вокруг которых образовались зоны задержки роста тест-организма. Из этих участков выделяют чистые культуры организмов и изучают их.

Метод обогащения почвы. Почву, из которой предполагают выделить антагонисты, обогащают организмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. С этой целью к образцам почвы, помещенным в стеклянные сосуды, систематически добавляют отмытую суспензию нужных микроорганизмов.

Затем через определенные промежутки времени такая почва высевается в виде отдельных комочек на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же самым организмом, который использовался для обогащения почвы.

Метод центрифугирования почвенной суспензии. Для выделения стрептомицетов из почв, и особенно из почв в весенне время, когда в ней развивается большое число грибов и бактерий, применяют метод центрифугирования почвенной взвеси. Метод основан на различии скоростей оседания отдельных видов микроорганизмов в центробежном поле. При 3000 об/мин в течение 20 мин частицы, соответствующие по размерам спорам плесеней или клеткам бактерий типа *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, осаждаются на дно пробирки. Частицы же, соответствующие по размерам спорам или отдельным обрывкам мицелия стрептомицетов, при данной скорости центрифугирования оказываются в поверхностном слое жидкости. Высевая надосадочную жидкость, в большинстве случаев (до 92%) на пластинках питательного агара удается получить только колонии актиномицетов.

Метод замораживания-оттаивания почвы. Известно, что в почве микроорганизмы находятся в адсорбированном на частицах состоянии. Для полноты десорбции микроорганизмов с почвенных частиц применяют химические методы, при которых почвенные образцы обрабатывают различными детергентами, и физические, в основе которых лежит метод механического растирания образцов почвы.

Для лучшей десорбции микроорганизмов с почвенных частиц рекомендуется использовать метод замораживания-оттаивания почвы. Суть метода состоит в следующем. Отобранный для выделения стрептомицетов образец почвы помещают в испаритель бытового холодильника при температуре -8 °C. Через час образец извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре до полного оттаивания. Процедуру замораживания-оттаивания повторяют дважды. Затем навеску почвы помещают в стерильную водопроводную воду, взбалтывают суспензию в течение 15 мин на круговой качалке при 230 об/мин, после чего различные разведения суспензии высеваются на питательную агаровую пластинку в чашках Петри.

Метод замораживания-оттаивания образцов почвы позволяет обнаружить в них в 1,2-3,6 раза больше стрептомицетов, чем в тех же образцах без замораживания.

Обработка почвенного образца карбонатом кальция. Увеличение числа выделенных культур стрептомицетов примерно на два порядка наблюдается при обработке почвенного образца карбонатом кальция и при инкубировании во влажных условиях. Образец почвы смешивают с порошком карбоната кальция в соотношении 10 : 1 и инкубируют во влажной камере при температуре 28 °C. Влажность обеспечивается путем помещения в чашки Петри кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных дистиллированной водой и прикрепленных к крышке чашки.

Применение питательных сред, содержащих антибиотики. Высев почвенной суспензии на агаровые пластинки вызывает трудности для развития редко встречающихся видов актиномицетов в результате быстрого размножения бактерий и широко распространенных в почвах видов актиномицетов. Поэтому для

направленного выделения определенных групп микроорганизмов в среды для высеива почвенной суспензии добавляют различные антибиотики. При добавлении антибиотиков к среде для культивирования микроорганизмов обычная микрофлора подавляется и создаются условия для развития устойчивых к этим антибиотикам форм микробов; последние могут оказаться новыми или редкими видами, способными образовывать и новые антибиотики. Для этих целей часто используют антибактериальные и противогрибковые препараты.

Обработка почвенной суспензии УФ-светом. Для селективного выделения определенных групп актиномицетов наряду с другими методами используют метод предварительной обработки природных субстратов физическими факторами. Известно, что различные группы актиномицетов обладают неодинаковой чувствительностью к ультрафиолетовому (УФ) облучению.

Использование СВЧ (волн сверхвысокой частоты). Образец почвы растирают в ступке, просевают через сито и перемешивают. 1 г почвы суспензируют в 100 мл воды, встряхивают в течение 10 мин и разводят 1 : 1000. В стерильные пробирки переносят по 2,5 мл суспензии и обрабатывают волнами СВЧ. Для этого можно использовать микроволновую печь марки «Р1и1оп» с рабочей частотой 2640 МГц.

2. Методы идентификации микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ

При определении вида микроорганизма используется большой спектр признаков: культуральные свойства, морфологию и организацию клеток, физиологические и биохимические особенности организма, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК, ДНК-ДНК-гибридизацию и т.д.

Метод перекрестного антагонизма. Сущность метода состоит в следующем. Агаровые блочки с одним видом выращенного стрептомицета помещают на поверхность агаровой пластинки, засеянной другим видом стрептомицета. В качестве тест-культуры наряду с другими используют тот же штамм организма. При этом обнаруживается, что один вид стрептомицета-антагониста может подавлять рост других видов стрептомицетов и не подавляет развитие своего вида

Использование организмов, устойчивых к определенному антибиотическому веществу. В основу этого метода положены два главных признака, связанных с образованием и действием антибиотиков:

1. Каждый антибиотик вырабатывается одним или несколькими определенными видами микробов.

2. Микроорганизмы, устойчивые к одному антибиотику, устойчивы и к антибиотическим веществам, близким к нему по химическому строению и биологическим свойствам. Вместе с тем они могут быть чувствительны к антибиотикам другой химической природы и, следовательно, обладать другим биологическим действием.

Метод хроматографии. Метод особенно важен при идентификации антибиотиков на ранних стадиях исследования. Для обнаружения антибиотиков на хроматограммах применяют биологические, химические и физические методы. Наиболее распространенным методом обнаружения антибиотиков на хроматограммах является биоавтографический метод.

1. 7 Лекция № 7 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, образуемые бактериями»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Антибиотики, образуемые собственно бактериями

2. Цианобактерии

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотики, образуемые собственно бактериями

По химической природе почти все бактериальные антибиотики — полипептиды или белки. Это представляет особый интерес в связи с изучением путей биосинтеза названных веществ и использованием этих путей в качестве моделей для изучения проблем биосинтеза полипептидов вообще, что имеет большое теоретическое значение.

К настоящему времени известно около 1000 антибиотиков бактериального происхождения, но мы остановимся лишь на некоторых наиболее характерных представителях этой группы, имеющих практическое или теоретическое значение; к ним относятся тиротрицин, грамицидины, полимиксины, бацитрацины, низины и некоторые другие.

Гомопептидные соединения. В эту подгруппу входят тиротрицин, грамицидины и бацитрацины. Тиротрицин обладает бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении грамположительных бактерий и главным образом гноеродных кокков. Преимущество тиротрицина состоит в том, что он действует на те патогенные микробы (например, фекальный стрептококк), на которые не влияют ни пенициллин, ни сульфаниламидные препараты. Грамотрицательные бактерии устойчивы к действию антибиотика. В 1941 г. было выявлено, что тиротрицин состоит из двух разных полипептидов. Их разделили и дали самостоятельные названия — тироцидин и грамицидин. В процессе разделения грамицидиновой фракции установлено, что грамицидин А находится в преобладающем количестве. В отдельных препаратах грамицидиновой фракции содержится около 85% грамицидина А, 9% грамицидина В, 6% грамицидина С и следы грамицидина D.

Бацитрацины обладают высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий и почти не действуют на грамотрицательные формы. Механизм действия антибиотика в основном связан с нарушением функции клеточной мембраны, следствием чего является подавление синтеза белка и клеточных стенок чувствительных к бацитрацину бактерий. При добавке в корма сельскохозяйственных животных бацитрацины могут стимулировать их рост. Однако использование антибиотических веществ в пищевых продуктах должно быть резко ограничено и находиться под строгим контролем компетентных органов.

Гетеромерные пептиды. В эту подгруппу входят полимиксины. Полимиксины — это родственные антибиотические вещества полипептидной природы, образуемые различными штаммами *Bacillus polymyxa* и *B. circulans*. Особенность группы полимиксинов заключается в том, что в составе их молекул имеется 4-5 свободных γ -аминных групп α , γ -диаминомасляной кислоты, что придает полимиксинам свойство катионных детергентов, способных образовывать комплексы с фосфолипидами клеточных мембран. Этим и определяется их антибактериальная активность. Полимиксины отличаются характером побочных реакций. Так, полимиксины А и О обладают высокой нефротоксичностью, в то время как полимиксины В и Е (колистины) — препараты наименее токсичные.

2. Цианобактерии

В соответствии с современными взглядами к бактериям относятся все организмы, имеющие прокариотный тип организации клетки. Это дало основание отнести группу синезеленых водорослей к бактериям, которые получили название цианобактерий. К настоящему времени выделено более 300 видов чистых культур этих микроорганизмов, относящихся более чем к 20 родам.

Цианобактерии очень мало изучены с точки зрения образования ими антибиотических веществ. Известно, что эти микроорганизмы, обитающие как в пресных, так и в морских водах, способны выделять ряд токсических соединений, которые можно рассматривать в качестве антибиотических веществ.

Антибиотические вещества, продуцируемые цианобактериями, обобщенно называют цианобактеринами. Среди этих веществ можно назвать антибиотик малинголид, вырабатываемый морской цианобактерией *Lyngbya majuscula*. Он обладает антибактериальной активностью в отношении *Mycobacterium smegmatis* и некоторых грамположительных бактерий.

1. 8 Лекция № 8 -9-10 (6 часов).

Тема: «Антибиотики, образуемые актиномицетами»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Стрептомицин
2. Дигидрострептомицин
3. Неомицины
4. Тетрациклины
5. Макролиды
6. Полиэны

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Стрептомицин

Стрептомицин — это один из классических, преимущественно противотуберкулезных антибиотиков. К настоящему времени выделен ряд аминогликозидов, превосходящих по своим свойствам стрептомицин и заменяющих его в медицинской практике. Однако условия образования, механизм биосинтеза и свойства этого антибиотика изучены очень подробно.

Условия биосинтеза стрептомицина. Физиолого-биохимические особенности развития *Streptomyces griseus*. Ферментативная деятельность продуцента стрептомицина. Изучение путей биосинтеза стрептомицина. Промышленное получение стрептомицина. Выделение стрептомицина из культуральной жидкости. Стабильность стрептомицина. Зависимость антибиотической активности стрептомицина от рН среды и ее состава. Антибиотические свойства стрептомицина. Токсические и лечебные свойства стрептомицина.

2. Дигидрострептомицин

При каталитическом гидрировании стрептомицин присоединяет два атома водорода и переходит в дигидрострептомицин. Дигидрострептомицин по химиотерапевтическому и фармакологическому действию близок к стрептомицину. Соединение приобрело значение после того, как было установлено, что оно менее токсично в отношении вестибулярных расстройств, чем стрептомицин. Дигидрострептомицин при обработке щелочью не образует малютола, стрептомицин же в этих условиях образует малютол. Дигидрострептомицин производят в промышленных условиях в виде сульфата или гидрохлорида. В качестве лечебного препарата применяют парааминосалициловую соль дигидрострептомицина (пасомицин). Пасомицин используют при лечении различных форм туберкулеза, гнойных процессов и других заболеваний. Другими практически ценными препаратами дигидрострептомицина являются пантомицин

(пантотеновокислая соль дигидрострептомицина) и аскорбиновокислая соль дигидрострептомицина.

3. Неомицины.

В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae*, изолированной из почвенного образца, выделили новый широкоспектровый антибиотик неомицин. Было установлено, что он состоит из смеси антибиотиков, которая получила название неомицинового комплекса. Комплекс включает неомицин А (неамин), неомицины В, С, Б, Е и Р. Неомицины не теряют antimикробных свойств при длительном (до двух лет) хранении как в виде растворов, так и в твердом состоянии. Антибиотик активен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Его antimикробный спектр сходен со спектром стрептомицина, однако действие отличается. Так, неомицин подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*, грибов, а также вирусов и протозоа.

В 1957 г. Х. Уmezava с сотрудниками описал антибиотик канамицин, образуемый *Streptomyces kanamyceticus*. Позднее было установлено, что этот стрептомицет образует три антибиотика: канамицин А, канамицин В и канамицин С.

По биологическим свойствам канамицин А сходен со стрептомицином и неомицинами. Его антибиотическая активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* близка к стрептомицину, однако канамицин более активен в отношении *E. coli*.

Канамицин в организме животных проявляет антивирусную активность в отношении вируса Западного Нила. Эта активность, по-видимому, связана с тем, что антибиотик индуцирует биосинтез интерферона. Благодаря своим положительным свойствам канамицин А применяется в медицине в качестве противотуберкулезного препарата, для борьбы со стафилококковыми заболеваниями, а также для лечения сибирской язвы, гонореи и других инфекций, не поддающихся лечению другими антибиотиками.

4. Тетрациклины

В группу антибиотиков тетрациклического ряда входят вещества, имеющие близкое химическое строение. Тетрациклические антибиотики привлекли большое внимание исследователей благодаря их важному практическому значению. Эти соединения обладают широким антибиотическим спектром в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и успешно применяются в медицинской практике. Кроме того, некоторые из этих антибиотиков используются в животноводстве как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птиц. Ценность тетрациклических антибиотиков определяется их высокой биологической активностью и относительно низкой токсичностью. Эта группа антибиотиков до настоящего времени сохраняет важное значение при лечении заболеваний дыхательных путей и инфекций, вызываемых возбудителями, устойчивыми к другим антибиотикам: хламидиями, риккетсиями, спирохетами, микоплазмами. Тетрациклины играют существенную роль в профилактике и лечении холеры.

К тетрациклическим антибиотикам, в основном образуемым в процессе биосинтеза тремя микроорганизмами, относится более 30 соединений. На их основе получен ряд полусинтетических препаратов, нашедших применение в медицинской практике.

К наиболее широко известным тетрациклическим антибиотикам принадлежат тетрациклин, 6-деметилтетрациклин, 7-хлортетрациклин, 7-хлор-6-деметилхлортетрациклин, 7-бромтетрациклин, 5-окситетрациклин, а также

метациклин, доксициклин и миноциклин, полученные в результате химической модификации молекулы окситетрациклина. Первым был открыт 7-хлортетрациклин, с которого мы и начнем рассмотрение этой группы антибиотических веществ.

5. Макролиды

Антибактериальные продукты метаболизма представителей различных групп микроорганизмов, имеющие слабощелочные свойства и относительно большую молекулярную массу, были названы Вудвардом в 1957 г. макролидами. В группу макролидных антибиотиков входит более 50 соединений, из которых наиболее хорошо изучены эритромицин, карбомицин, пикромицин, метимицин, спирамицин, олеандомицин, розамицин, джозамицин и др.

Группа макролидных антибиотиков в основном подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также микоплазм. Многие соединения этой группы оказывают бактериостатическое действие в отношении форм бактерий, устойчивых к таким широко используемым антибиотикам, как стрептомицин, пенициллин, тетрациклины, что имеет существенное практическое значение. Эти антибиотики привлекли к себе внимание практических врачей как препараты с большей биологической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и хорошими фармакологическими свойствами. Особый интерес вызывают эритромицин и его химические модификации.

6. Полиены

В группу полиеновых антибиотиков входит большое число противогрибных соединений, образуемых стрептомицетами. Особенностью их строения является наличие в макроциклическом лактонном кольце сопряженных двойных связей. К полиенам относятся нистатин, амфотерицин В, микогептин, леворин и другие соединения. Нистатин образуется культурой *Streptomyces noursei*. Антибиотик обладает противогрибным действием и не проявляет антибактериальной активности. Механизм антимикробного действия этого антибиотика связан с нарушением клеточной мембранны грибов, содержащих холестерол или эргостерол. Антибиотик образует с последним каналы мембран путем комплексообразования, что индуцирует потерю клетками грибов низкомолекулярных соединений. Эргостерол в цитоплазматической мемbrane грибов контролирует текучесть и целостность мембранны и ее биологические функции. Резистентность к нистатину связана или с отсутствием эргостерола, или с очень низким его содержанием в клетках. Нистатин может быть использован в медицинской практике для лечения заболеваний, вызываемых *Candida*.

Микогептин образуется мутовчатым актиномицетом, относящимся к роду *Streptovetrinellum*. Микогептин подавляет рост большого числа грибов, в частности дрожжеподобных грибов рода *Candida*, криптококки, аспергиллы, пенициллы. Ценное свойство этого антибиотика — способность подавлять рост кокцидоидоза — одного из наиболее опасных грибных заболеваний. Антибиотик подавляет рост дерматофитов и трихомонад (простейших). Микогептин, как и другие полиены, — фунгистатик. Он обладает высокой эффективностью при лечении микозов, более эффективен при оральном способе введения, чем амфотерицин В.

Леворин образуется в процессе развития *Streptomyces levoris*. Наряду с другими антибиотиками (nistatinom, amphotericinom B, kanamycinom, triamcinolonom) леворин обладает высокой противогрибной активностью, подавляя развитие дрожжей и дрожжеподобных организмов; менее активен он в отношении мицелиальных грибов.

Леворин применяют при заболеваниях, вызываемых дрожжеподобными грибами (при межпальцевых эрозиях, поражениях складок кожи, слизистых

оболочек рта, при кандидозе желудочно-кишечного тракта). Для лечения наружных заболеваний леворин употребляют в виде мазей, при лечении желудочно-кишечного тракта — в виде таблеток или капсул. В ряде случаев леворин используют для ингаляций.

1. 9 Лекция № 11-12 (4 часа).

Тема: «Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Пенициллин
2. Цефалоспорины и цефамицины

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Пенициллин

Условия образования пенициллина. Пенициллин относится к группе β -лактамных антибиотиков. Антибиотики этой группы образуются не только плесневыми грибами, но и некоторыми видами стрептомицетов и нокардий.

Получение пенициллина — замечательная веха в развитии микробиологии, химии и медицины. С производством этого антибиотика связано создание вначале довольно скромной, а затем весьма мощной антибиотической промышленности, формирование современной биотехнологии. Для высокого выхода пенициллина требуются следующие условия развития гриба: хороший рост мицелия, достаточное обеспечение культуры питательными веществами и кислородом, оптимальная температура (в период первой фазы 30 °C, в период второй фазы 20 °C), уровень pH ниже 8,0 (но не ниже 7,0), медленное потребление углеводов, подходящий предшественник. Для начального периода фазы роста гриба желательно иметь pH среды ниже 7,0 и обязательно присутствие в среде легкодоступного источника углерода. Медленное потребление углеводов во время фазы образования пенициллина достигается либо использованием лактозы, либо дробным внесением глюкозы или другого сахара.

Химическое строение пенициллина. Изучение химической структуры пенициллина проводилось одновременно английскими и американскими исследователями в период Второй мировой войны. Основным ядром молекулы антибиотика является бициклическая структура, состоящая из β -лактамного и тиазолидинового колец.

Предшественники биосинтеза пенициллина. Большую роль в биосинтезе пенициллина определенного типа и в увеличении его выхода играют так называемые предшественники. Предшественниками могут служить только те органические вещества субстрата, которые в процессе биосинтеза антибиотика тем или иным путем включаются в его молекулу. Продуцент пенициллина включает в молекулу антибиотика некоторые органические соединения или часть их без предварительного расщепления на отдельные фрагменты и последующего ресинтеза. В зависимости от штамма для синтеза антибиотика используются разные количества предшественников (от 0,1 до 10%). При этом от 5 до 30% предшественника остается в среде, а большая часть его окисляется организмом до CO₂ и воды, т.е. потребляется по другим путям обмена веществ. Однако в определенных условиях отдельные штаммы превращают в антибиотик практически весь объем предшественника (фенилацетамид), если его начальная концентрация не превышает 1 мг/мл.

Полусинтетический способ получения пенициллинов. В настоящее время большое значение имеет так называемый полусинтетический (биологический +

химический) способ получения аналогов природного пенициллина, обладающих рядом ценных свойств.

Все известные пенициллины подобно бензилпенициллину подавляют синтез клеточной стенки бактерий.

Наиболее ценными с практической точки зрения полусинтетическими препаратами пенициллина 1-го поколения следует считать ампициллин, оксациллин, клоксациллин, нафциллин, метициллин, амоксициллин.

Выделение пенициллина. Первый этап выделения пенициллина, как и многих других антибиотиков, накапливающихся в культуральной среде, связан с отделением мицелия гриба от культуральной жидкости путем фильтрации или центрифугирования. Во избежание потерь антибиотика мицелий гриба отделяют и промывают. В настоящее время пенициллин из культуральной жидкости обычно извлекают методом экстракции антибиотика органическими растворителями, не смешивающимися с водой (амилацетат, хлороформ, бутилацетат, бутиловый спирт и др.).

Действие пенициллина на бактерии. Пенициллин оказывает антимикробное действие в отношении некоторых грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки и некоторые другие) и практически неактивен в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжей. Чувствительные к пенициллину микроорганизмы относительно легко и быстро приобретают устойчивость к антибиотику.

Микроорганизмы, приобретшие устойчивость к определенному типу пенициллина, как правило, резистентны и к другим типам пенициллина. У бактерий устойчивость к пенициллинам связана с их способностью образовывать фермент β -лактамазу.

Применение в медицине. 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. 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). 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.

2. Цефалоспорины и цефамицины

По химическому строению антибиотики принадлежат к группе β -лактамных соединений, близких к пенициллинам. Цефалоспорины — антибиотики, образуемые грибами из рода *Cepholosporium*. Основной продуцент этих антибиотиков — гриб *C. acremonium*. 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.

Механизм биосинтеза цефалоспорина. В процессе развития *C. acremonium* наряду с цефалоспорином С продуцируется пенициллин N, причем биосинтез последнего идет тем же путем, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Следовательно, первичные стадии биосинтеза пенициллина и цефалоспорина идентичны.

Полусинтетические аналоги цефалоспорин. 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.

В результате химической модификации основного ядра цефалоспорина — 7-аминоцефалоспорановой кислоты удалось получить ценные лечебные препараты.

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., из них около 100 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.) обладают высокой биологической активностью в отношении стафилококков, стрептококков, пневмококков, многих видов энтеробактерий.

Цефалоспорины II поколения (цефамандол, цефокситин, цефуроксим и др.) характеризуются высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, устойчивы к действию β -лактамаз. Они не оказывают заметного действия на энтерококки.

Цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефаклор, цефтазидим, цефтриаксон, цефтизоксим, цефоперазон, цефпирамид и ряд других) отличаются высокой антимикробной активностью в отношении энтеробактерий, в том числе устойчивых к другим антибиотикам. Группа цефалоспоринов, относящихся к III поколению, устойчива к действию β -лактамаз, образуемых грамотрицательными бактериями. Для них характерна повышенная антибиотическая активность в отношении *E. coli*, ряда штаммов *Proteus*, *Enterobacter*. Вместе с тем они обладают умеренной активностью по отношению к стафилококкам. Особый интерес представляет цефтриаксон, цефпирамид. Цефтриаксон способен в течение длительного периода времени сохраняться в организме больного: период его полувыделения из организма человека составляет 8 ч. Эта особенность препарата позволяет применять его всего лишь раз в день.

Цефпирамид (тамицин) обладает широким спектром антибактериального действия. Он подавляет рост аэробных и анаэробных форм грамположительных и грамотрицательных бактерий. Цефпирамид легко проникает через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и взаимодействует с пенициллинсвязывающими белками. Находит применение в медицинской практике при лечении различных бактериальных инфекций, в том числе при лечении заболеваний верхних дыхательных путей, хирургических и гинекологических инфекций.

Цефалоспорины III поколения широко применяются в медицинской практике.

Цефалоспорины IV поколения (цефпиром, цефепим и др.). Цефпиром имеет биполярную структуру (несет один положительный и один отрицательный заряд). Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов, устойчив к β -лактамазам. Высокий бактерицидный эффект цефпирома связан с тем, что антибиотик с большой скоростью проникает через клеточную стенку бактерий (быстрее в 5-20 раз, чем цефотаксим и цефтриаксон), обладает высоким сродством к пенициллинсвязывающим белкам, низкой степенью гидролиза β -лактамазами. Находит практическое применение при

лечении инфекций нижних дыхательных и мочевыводящих путей, а также гинекологических и других заболеваний.

Цефепим обладает необычными биологическими свойствами: низким сродством к β -лактамазам и очень быстрым транспортом в периплазматическое пространство. Практически не обнаружена резистентность к нему чувствительных штаммов энтеробактерий.

1. 10 Лекция № 13 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, образуемые высшими растениями»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Антибиотические вещества высших растений
2. Растительные антибиотики

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотические вещества высших растений.

Многие отечественные исследователи, изучавшие высшие растения, обращали внимание на то, что сок некоторых из них обладает бактерицидными свойствами или инактивирует токсическое действие других организмов. Однако наиболее подробно антибиотические вещества высших растений были изучены Б.П. Токиным. Еще в 1928 г. он обратил внимание на то, что если под стеклянный колпак поместить ветку черемухи (весной или летом) и рядом с ней поставить стакан с Protozoa в воде, то через 15-20 мин все простейшие погибают. Следовательно, летучие вещества, выделяемые черемухой, обладают антипротозойным действием. Биологически активные вещества высших растений Б.П. Токин назвал фитонцидами. Фитонциды — продукты жизнедеятельности растений, обнаруженные у представителей всех групп высших растений. Наибольшим антибиотическим свойством обладают фитонциды лука, чеснока и некоторых других растений. Известно, что фитонциды представляют собой не отдельные вещества, а комплексы соединений. Фитонцидными свойствами обладают бальзамы, смолы, вещества хиноидного строения, дубильные вещества, содержащие лактонное кольцо, глюкозиды, антоцианы и другие соединения.

Фитонциды некоторых растений способны стимулировать или подавлять развитие других растений на расстоянии. Обнаружены летучие фитонциды, способные убивать пыльцу других растений или стимулировать ее развитие. Внешние повреждения растений (ранения) способствуют образованию летучих фитонцидов. Этот факт указывает на их приспособительное значение.

Растения одного вида, выращенные в разных условиях, образуют несколько отличные друг от друга фитонциды. Биологическая активность фитонцидов одного и того же растения зависит от сезона года: например, осенью хвоя сосны менее бактерицидна, чем хвоя, собранная в мае или июне.

К настоящему времени из высших растений выделено более 700 антибиотических веществ, способных подавлять развитие бактерий, вирусов, угнетать рост опухолевых клеток. Антибиотики, выделенные из высших растений, имеют разнообразное химическое строение и относятся к различным группам соединений. Среди них встречаются алифатические соединения, алкалоиды и хиноны, эфирные масла и терпеновые соединения, полифенолы, кумарины и др. К числу наиболее изученных растительных антибиотиков относятся аллицин, берберин, госсипол, хинин и многие другие.

2. Растительные антибиотики.

Аллицин — продукт жизнедеятельности чеснока (*Allium sativum*) — выделен и подробно изучен К. Коваллито с сотрудниками в 1944 г. Антибиотик выделяют из чеснока экстракцией органическими растворителями и очищают перегонкой с водяным паром.

Берберин — антибиотик алкалоидной природы. Выделяется из ряда видов растений: лютиковых, луносемянниковых, барбарисовых. Этот антибиотик подавляет развитие стафилококков, стрептококков, гонококков, сальмонелл.

Госсипол - антибиотическое вещество выделяется из семян хлопчатника мохнатого. Этот антибиотик обладает выраженным антивирусным действием, слабо активен по отношению к бактериям.

Хинин известен с доисторических времен как средство для лечения больных малярией. Этот алкалоид выделяется из хинного дерева красносокового.

Хинин наряду с угнетением жизнедеятельности эритроцитарных форм малярийных плазмодиев подавляет рост стрептококков, микобактерий, протея, кишечной палочки. Он нарушает функцию клеточных мембран, ингибитирует отдельные флавопротеиновые ферменты и холинэстеразы.

Рицин — это белковое, биологически высокоактивное вещество, продуцируемое высшими растениями: клещевиной и омелой белой. Этот растительный белок представляет особый интерес в связи с механизмом его биологического действия, приводящего к быстрой гибели клетки животных.

Фитоалексины вырабатываются в результате проникновения в растение определенного паразита. Процесс биосинтеза фитоалексинов индуцируется соответствующим сигнальным соединением, находящимся или в клеточной стенке паразита, или же в клеточных стенках самих высших растений.

Характерно, что выработанный под влиянием определенного паразита фитоалексин обладает антибиотическим действием по отношению к этому паразиту.

В настоящее время изучено строение некоторых фитоалексинов. К ним относятся 6-метоксибензоксазолин, пизатин и фазеолин. Поврежденные ткани пшеницы, ржи и кукурузы образуют аналогичные вещества, угнетающие развитие некоторых видов бактерий, грибов, а также насекомых, повреждающих эти растения. В растениях гороха под влиянием некоторых видов фитопатогенных грибов образуется антибиотическое вещество пизатин, подавляющее развитие этих же фитопатогенных грибов. В клетках фасоли, в которые попадает фитопатогенный гриб, образуется антибиотик фазеолин.

1. 11 Лекция № 14 (2 часа).

Тема: «Антибиотики животного происхождения»

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Лизоцим
2. Экмолин
3. Интерферон

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

1. Лизоцим

Еще в 1909 г. русский ученый П.Н.Лащенков обратил внимание на то, что белок куриного яйца обладает антибактериальным действием. Спустя 13 лет после опубликования наблюдений П.Н. Лащенкова английский ученый А. Флеминг отнес этот белок к энзимам, а также обнаружил, что аналогичным действием обладают выделения ряда тканей человека и животных, растений и микробов. Он назвал эти

антибиотические вещества лизоцимом. Н.А. Красильников и А.И. Кореняко в 1939 г. из культуры *Actinomyces violaceus* выделили антибактериальный фактор, лизирующий кокки (лизоцим). А.Е. Крисс (1940) подробно изучил этот лизоцим и показал, что он идентичен актиномицетину.

Лизоцим обнаружен в белке куриного яйца, селезенке, сердце, печени, легком, в различных секреторных выделениях (слезы, слизь носа, слюна и др.), в соках некоторых растений, у микроорганизмов и бактериофагов.

Более полно изучен лизоцим, выделенный из белка куриного яйца. Кристаллический лизоцим получают непосредственно из яичного белка путем адсорбции на бентонитной глине. С глины лизоцим элюируют 5%-м водным пиридином при pH 5, затем фермент осаждают сернокислым аммонием, подвергают диализу и лиофильно сушат.

Лизоцим белка куриного яйца активен в отношении грамположительных бактерий (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*). Менее чувствительны к лизоциму грамотрицательные бактерии. Под влиянием лизоцина происходит лизис чувствительных к нему клеток, что связано прежде всего с действием этого вещества на клеточные стенки, которые при этом разрушаются, а цитоплазматическое содержимое клеток «изливается».

Лизоцим активно действует на клеточную стенку бактерий — непосредственно на пептидогликан, он гидролизует β -гликозидные связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюказамина в пептидогликане бактериальной стенки, что приводит к распаду полимера и лизису бактериальной клетки.

Под влиянием лизоцима некоторые виды грамположительных бактерий выделяют нуклеиновые кислоты. Этот фермент называют также мурамидазой.

Лизоцим не проявляет токсических свойств в отношении организма человека или животных, наоборот, он подобно биостимулятору активирует защитные свойства макроорганизма. В организме животных лизоцим выполняет защитную функцию в отношении проникновения сапрофитных и патогенных микроорганизмов.

2. Экмолин

Антибиотический препарат экмолин выделен З.В. Ермольевой и ее сотрудниками в 1950 г. из рыб. Установлено, что органы и ткани некоторых рыб оказывают антибактериальное действие в отношении грамположительных и грамотрицательной микрофлоры.

Экмолин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, активен в отношении дизентерийных и тифозных палочек, кишечной палочки и холерного вибриона, стафилококков, стрептококков и вируса гриппа.

Экмолин — это смесь белков протаминов (молекулярная масса не более 10 000), богатых диаминомонокарбоновыми кислотами. Он малотоксичен. В сочетании с пенициллином и новокаином увеличивает антибиотическую активность пенициллина в организме больного.

3. Интерферон

К антибиотикам животного происхождения следует отнести также белковое вещество интерферон, образующееся в клетках под действием вирусов, а также некоторых видов бактерий, бактериальных эндотоксинов или синтетических полимеров. Интерферон открыт в 1957 г. Айсексом и Линленманном. Известно несколько видов интерферона, определяемых характером индуцирующего фактора. Все эти препараты — слабокислые белки с молекулярной массой примерно 30 000.

Для получения больших количеств интерферона используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными

словами, для получения этого вещества создают определенную систему вирус-клетка.

В последнее время благодаря успехам генной инженерии удалось изолировать из клеток человека ген, ответственный за биосинтез интерферона, и встроить его в ДНК соответствующего вида микроорганизма. В результате получен микроб, способный в процессе развития синтезировать этот ценнейший биорегуляторный белок.

Интерферон подавляет размножение вирусов. В связи с этим в последнее время он привлекает внимание как лекарственный препарат при вирусных инфекциях.

Животный организм может вырабатывать интерферон в ответ на введение стимуляторов интерферонообразования. Это явление представляет большой интерес и может быть использовано в качестве профилактического фактора при заболеваниях, вызываемых вирусами.

1.12 Лекция № 15 (2 часа).

Тема: «Направленный биосинтез антибиотиков»

1.12.1 Вопросы лекции:

1. Направленный биосинтез антибиотиков
2. Изменение состава питательной среды
3. Воздействие микроорганизма или его ферmenta

1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1. Направленный биосинтез антибиотиков

Под направленным биосинтезом антибиотиков следует понимать вмешательство экспериментатора в метаболизм организма-продуцента (главным образом микроорганизма) для получения одного либо нескольких антибиотиков или же новых по сравнению с обычно образующимися соединениями форм антибиотических веществ.

В результате направленного биосинтеза удается модифицировать известные антибиотики, отличающиеся от исходных веществ рядом ценных свойств, которые не могут быть синтезированы химическим путем. Поэтому изучение вопросов, связанных с названной проблемой, имеет существенное теоретическое и практическое значение.

Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности способны одновременно образовывать несколько антибиотических веществ, как близких по химическому строению и биологическому действию, так и значительно различающихся. Например, *Streptomyces albireticuli* вырабатывает три антибиотика: эйромицин, энтеромицин и карбомицин. В культуре *S. showdoensis* одновременно образуется четыре антибиотика: актиномицин в мицелии и три антибиотика в культуральной жидкости: макролид, шоудомицин и антибиотик неизвестной природы. В культуре *S. Netropsis* одновременно образуются антигрибные полиеновые антибиотики (смесь тетраена, пентаена и гептаена) и антибактериальное вещество.

Изучение закономерностей биосинтеза того или иного антибиотического вещества, выяснение условий развития организма, обеспечивающих преимущественное образование одного из возможных антибиотиков, дает возможность вмешиваться в биосинтетическую деятельность микробы и давать ей нужное направление.

Для направленного образования преимущественно одного из ряда естественно синтезируемых антибиотиков или их модификации применяют различные методы вмешательства в обмен веществ микроорганизмов.

Во-первых, это достигается соответствующим изменением условий культивирования продуцентов антибиотиков, и прежде всего изменением состава среды.

Во-вторых, в среду для культивирования микроорганизма — продуцента антибиотического вещества могут вводиться специфические ингибиторы.

В-третьих, характер обмена веществ микроорганизма, связанного с модификацией структуры образуемого антибиотика, может быть изменен в результате получения от исходного штамма-продуцента соответствующих мутантов.

В-четвертых, свойства известных антибиотических веществ можно изменить в результате воздействия на эти антибиотики одного из микроорганизмов или ферментов, образуемых ими.

В-пятых, изменить характер метаболизма, связанный с биосинтезом антибиотика, можно путем применения комбинации перечисленных выше факторов. Например, используют соответствующие мутанты с одновременным внесением в среду для их развития специфических предшественников или ингибиторов.

2. Изменение состава питательной среды

Биосинтетической деятельностью микроорганизмов можно управлять путем изменения условий культивирования организма, и в первую очередь состава питательной среды. Рассмотрим основные способы изменения условий культивирования микроорганизмов, позволяющие осуществлять направленный биосинтез антибиотиков.

1. Введение в среду веществ, которые, включаясь в молекулу антибиотика, обеспечивают получение препарата с новыми свойствами, широко применяется при биосинтезе различных форм пенициллинов.

2. Добавление в среду отдельных аминокислот, органических кислот (в виде солей) или иных компонентов, принимающих участие в обмене веществ организма, позволяет целенаправленно изменять биохимическую деятельность микробы в сторону преимущественного биосинтеза одного из ряда возможных антибиотиков или препарата с новыми свойствами.

3. Направление биосинтетической деятельности микроорганизма путем изменения соотношения концентрации источников углерода и азота в среде или же степени аэрации культуры.

4. Изменение активной кислотности (рН) среды. В результате изменения рН среды для культивирования микроорганизмов можно направленно получать различные формы антибиотиков.

3. Воздействие микроорганизма или его ферmenta

Направленно изменять свойства антибиотиков в процессе развития продуцента можно воздействуя на них определенным микроорганизмом или образуемым им ферментом. Применение микроорганизмов для трансформации различных органических соединений, в том числе и антибиотиков, — широко распространенное явление. Трансформация веществ может осуществляться развивающейся культурой соответствующих микроорганизмов, экстрактами, выделенными из клеток, или чистыми ферментными системами.

Реакции, которые могут проявлять микроорганизмы в отношении антибиотических веществ, весьма разнообразны: реакции окисления, восстановления, гидролитические реакции, реакции конденсации, изомеризации, образование новых C=C-связей и осуществление гетерофункций.

В большинстве случаев антибиотики, модифицированные биологическим способом, *in vitro* существенно теряют биологическую активность. Однако в организме больного они могут проявлять антибиотические свойства.

1. 13 Лекция № 16 (2 часа).

Тема: «Характер и механизм биологического действия антибиотиков»

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Общие сведения о действии антибиотиков
2. Поглощение антибиотиков клетками микробов

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общие сведения о действии антибиотиков

Характер и механизм биологического действия антибиотиков зависит прежде всего от их химической природы, от концентрации препарата, вида организма и микроструктуры его клеток, от условий проявления действия и других факторов.

Уже первое знакомство с действием антибиотиков на микроорганизмы показывает, что одни из них — бензилпенициллин, фумагиллин, бациллацин, сарцидин — подавляют развитие сравнительно ограниченного числа видов бактерий, другие — тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин, карбомицин — подавляют рост многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и некоторых других групп организмов. Таким образом, антибиотики не обладают универсальным свойством убивать все живое, что находится в контакте с ними. Одни организмы оказываются чувствительными, а другие — устойчивыми к действию антибиотиков. Иногда под влиянием антибиотиков (например, стрептомицина) из числа вначале чувствительных форм бактерий возникают антибиотикозависимые варианты, не развивающиеся в отсутствие данного антибиотика.

Действие антибиотика на определенные организмы характеризуется его антимикробным спектром. В зависимости от природы антибиотика, его концентрации, времени действия, микроструктуры клетки организма, в контакте с которым находится антибиотик, и внешних условий — температуры, pH, gH₂, а также других факторов антибиотические вещества могут проявлять цитостатическое (задерживать рост клеток), цитоцидное (убивать клетки) или цитолитическое (растворять клеточную стенку и в результате приводить клетки к гибели) действие. Антибиотики близкого химического строения обычно имеют сходный антимикробный спектр.

Каждый антибиотик имеет свои оптимальные границы pH, где проявляется его максимальная антимикробная активность.

Большое влияние на характер действия антибиотиков оказывает их концентрация. Суббактериостатические дозы некоторых антибиотических веществ не только не угнетают рост чувствительных к ним микробов, но, наоборот, стимулируют их развитие. Как правило, при концентрации антибиотика выше дозы, вызывающей бактериостатический эффект, наблюдается бактерицидное действие препарата.

Если вещество обладает бактериостатическим, бактерицидным или бактериолитическим свойством, то это указывает лишь на конечный результат действия антибиотика, а не на механизм, при помощи которого получен тот или другой биологический эффект.

Под механизмом биологического действия антибиотика следует понимать те изменения в биохимической деятельности клетки или, точнее, те нарушения путей обмена веществ микроорганизма, контролируемые соответствующими генами, которые вызываются данным препаратом и в конечном счете прекращают развитие или ведут к гибели организма.

Исследование действия антибиотика помогает вскрыть причины его биологического эффекта в отношении как микробной клетки, так и макроорганизма.

Изучение механизма биологического действия антибиотических веществ ставит своей целью определение нарушений обмена веществ, вызываемых антибиотиком в микробной клетке, установление точки или точек его главного, основного приложения в цепи обменных реакций, определение мишней (фермента или ферментов) действия антибиотика, выявление молекулярных основ действия антибиотического вещества, а также установление причин отсутствия аналогичного действия антибиотика на резистентные к нему формы микробов и макроорганизмы.

Несмотря на многообразие химического строения антибиотиков, образуемых разными группами организмов, все они обладают некоторой общностью первичного действия на микробные клетки: а) все антибиотики в той или иной степени адсорбируются клеткой (клеточной стенкой); б) все антибиотики подавляют рост чувствительных культур, даже в очень низких концентрациях; в) все антибиотики обладают избирательным биологическим действием в отношении видов (штаммов) бактерий.

Вместе с тем характер и особенно механизм биологического действия каждого антибиотического вещества специфичны. Даже биологическое действие одного и того же препарата в зависимости от условий среды, в которой он проявляет эффект, неодинаково.

При взаимодействии антибиотика с микробной клеткой он должен проникнуть в клетку и вступить в контакт с соответствующими ферментами, регулирующими те или иные жизненно важные процессы (синтез клеточной стенки, биосинтез белка, функции мембран и т.д.).

2. Поглощение антибиотиков клетками микробов

Первый этап взаимодействия микроорганизмов с антибиотиком — адсорбция его клетками. Связанные клеткой антибиотики способны проявлять двоякое действие: с одной стороны, некоторые из них могут действовать как поверхностно-активные вещества, а с другой стороны, проникая в глубь клетки, антибиотики нарушают отдельные звенья метаболизма.

Гибель клеток под действием поверхностно-активных антибиотиков может быть связана с повреждением механизма осмотического равновесия на поверхности микробной клетки, а также в результате скопления этих веществ у поверхности раздела жидкая фаза — микробная клетка. Изменения в регулировании осмотического давления сопровождаются повреждением клеточной стенки микробы. Нарушение проницаемости клеточной стенки является результатом или прямого влияния антибиотических веществ, или вторичных процессов.

Действие антибиотиков как поверхностно-активных веществ может вызывать диссоциацию белка с отделением от него простетических групп или нуклеиновых кислот. Такие антибиотики могут также денатурировать белки и, следовательно, непосредственно влиять на энзиматические системы, связанные с клеточной стенкой.

Таким образом, если антибиотик способен нарушать системы, регулирующие осмотические свойства клеточной стенки, иными словами, если

антибиотик выступает в качестве поверхностно-активного соединения, то он может оказывать бактерицидное действие. К числу антибиотических веществ, механизм действия которых связан с поверхностно-активными свойствами, относят грамицидин С, тироцидин, полимиксины, а также тетрациклины, если последние применяются в концентрациях, во много раз превышающих бактериостатические.

Вместе с тем антибиотики, попадая в микробную клетку, могут нарушать отдельные этапы метаболизма организма.

Они могут образовывать комплексы с определенными компонентами клетки, что способно привести к нарушению ее функций, подавлять некоторые звенья в цепи биохимических процессов как путем необратимого связывания антибиотиком одного из компонентов реакции, так и в результате конкурентного подавления биологически важных метаболитов клетки.

1. 14 Лекция № 17 (2 часа).

Тема: «Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков»

1.14.1 Вопросы лекции:

1. Механизм адаптации микроорганизмов к действию антибиотиков
2. Причины устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Механизм адаптации 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.

В связи с широким использованием антибиотиков в различных сферах практической деятельности возникновение устойчивых форм микробов приобретает 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.

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. Для выяснения вопроса об эффективности препарата обычно используют диски бумаги, пропитанные антибиотиками. Диски накладывают на питательную агаровую пластинку, засеянную выделенным возбудителем, и после определения чувствительности организма к одному из антибиотиков последний следует назначать больному, разумеется, при условии, что препарат не противопоказан по каким-либо другим причинам. При использовании дисков фильтровальной бумаги для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам необходимо соблюдать стандартные условия опытов, и в первую очередь необходимый состав питательной среды и соответствующую концентрацию испытуемого антибиотика.

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.

2. Причины устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков.

Теперь подробнее рассмотрим названные факторы, связанные с проявлением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

1. Состояние клеточной стенки, при котором она препятствует проникновению антибиотика внутрь клетки. Свойство клеточной стенки задерживать проникновение антибиотических веществ внутрь клетки иллюстрируется на примере пенициллиноустойчивых стафилококков. Количество антибиотика, связанного клетками, определяется степенью чувствительности бактерий: чем чувствительнее организм, тем больше он связывает пенициллина. С другой стороны, иногда клетки чувствительных к пенициллину стафилококков становятся устойчивыми к нему, если они образуют колонии, защищенные внеклеточным покровом, который препятствует проникновению антибиотика непосредственно к клеткам.

2. Способность клетки разрушать антибиотик раньше, чем он сможет проявить свое биологическое действие. Образование микробной клеткой веществ, способных инактивировать антибиотики, свойственно ряду микроорганизмов. Пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, хлорамфеникол и другие антибиотики легко разрушаются ферментами, продуцируемыми многими видами бактерий.

3. Изменение клеточных структур (рибосом, мемран и др.) или модификация активных центров антибиотика, находящегося в клетке, под действием ряда факторов. Резистентность бактерий к β -лактамным антибиотикам обусловлена степенью диффузии препарата через внешнюю мембрану и сродством антибиотика к пенициллинсвязывающим белкам (PBP-ферментам, принимающим участие в построении клеточной стенки и являющимся основной мишенью действия β -лактамных антибиотиков).

4. Способность бактерий снижать концентрацию антибиотика внутри клетки. Бактериальные клетки, чувствительные к антибиотикам, способны аккумулировать эти соединения внутри клеток. Резистентные же микроорганизмы благодаря системе энергозависимого выброса снижают концентрацию антибиотика внутри клетки и таким образом защищают себя от антибиотического действия этих соединений.

5. Нарушение мишени в микробной клетке, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику. Изменение ответственного за чувствительность микробной клетки к антибиотику звено (мишени) — один из существенных факторов, определяющих появление резистентных форм. Известно, что в большинстве случаев в качестве мишени в микробной клетке для действия антибиотиков служат ферменты или белки с неясно выраженной энзиматической активностью.

6. Перенос генов антибиотикорезистентности от устойчивых штаммов микроорганизмов к чувствительным. Такой перенос генов может происходить в результате конъюгации, трансдукции или посредством транслоцирующихся элементов, а также за счет мутаций в хромосомных и плазмидных генах.

Распространению устойчивых форм микроорганизмов способствуют лечебные медицинские учреждения, промышленные предприятия по производству антибиотиков и другие места, связанные с массовыми контактами людей и животных с антибиотическими препаратами. Здесь антибиотики создают благоприятный фон для селекции и сохранения резистентных форм микроорганизмов. Массовая и активная миграция населения также способствует распространению названных форм микроорганизмов. Антибиотики, различающиеся химическим составом и образуемые разными видами микробов, обладают неодинаковым механизмом биологического действия. Отличие в биохимической активности антибиотических веществ широко используется в химиотерапии: для предупреждения возникновения устойчивых форм применяют одновременно два или более антибиотика.

Однако бывают случаи, когда микробы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, становятся резистентными к действию других препаратов. Это перекрестная устойчивость, отмеченная для хлорамфеникола и тетрациклинов, для всех пенициллинов, полученных биосинтетическим путем, и некоторых других биологически активных веществ.

Перекрестная устойчивость отдельных видов микроорганизмов в отношении разных антибиотиков указывает на то, что механизм биологического действия этих веществ идентичен. Как правило, явление перекрестной устойчивости микробов обнаруживается у антибиотиков, близких по химическому составу, хотя есть и исключения, например хлорамфеникол и тетрациклины.

Нередко при концентрациях некоторых антибиотиков, значительно превышающих минимальные бактериостатические, рост всех клеток чувствительного к антибиотику микроорганизма не останавливается. При этом часть клеток способна расти и размножаться, наблюдается увеличение числа клеток и биомассы. В этом случае говорят о явлении «остаточного роста».

«Остаточный рост» не обусловлен возникновением устойчивых мутантов или популяционными сдвигами в сторону менее чувствительных клеток, а связан с медленным размножением части популяции. В этих условиях продолжают идти процессы, непосредственно антибиотиками не затрагиваемые.

Известно, что антибиотики, способные подавлять белковый синтез (хлортетрациклин, хлорамфеникол, эритромицин и др.), ингибируют этот процесс в клетках на уровне рибосом. Однако при относительно высоких концентрациях этих антибиотиков полного подавления синтеза белка не происходит; «остаточный синтез» белка составляет от 2 до 10%.

Синтез некоторых белков, в частности цитохромов а и б, по-видимому, локализованных в цитоплазматической мемbrane, устойчив к действию хлортетрациклина, хлорамфеникола и других антибиотиков, подавляющих синтез белка.

По всей вероятности, одной из причин «остаточного роста» чувствительных микроорганизмов в присутствии высоких концентраций антибиотиков, способных подавлять белковый синтез, может быть «остаточный синтез» белка в клетках.

Итак, под действием антибиотиков в микробной клетке происходит ингибирование вполне определенных звеньев (мишеней) метаболизма чувствительных к ним организмов. Блокирование той или иной мишени зависит как от химической структуры молекулы антибиотика, так и от особенностей строения клетки микроорганизма и происходящих в ней метаболических процессов, контролируемых соответствующими генами.

1. 15 Лекция № 18 (2 часа).

Тема: «Пути применения антибиотиков, сдерживающие возникновение устойчивых к ним форм микроорганизмов»

1.15.1 Вопросы лекции:

1. Меры борьбы с устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам
2. Сочетанное применение антибиотиков

1.15.2 Краткое содержание вопросов:

1. Меры борьбы с устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам.

При разработке научно обоснованной стратегии и тактики применения антибиотиков в медицине и ветеринарии необходимо учитывать экологические условия, и в первую очередь наличие в окружающей среде ксенобиотиков, резистентных к антибиотикам форм микроорганизмов и других факторов, резко меняющих действие того или иного антибиотика на макроорганизм. В медицинской практике в целях сдерживания процесса возникновения 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.

5. Применение иммобилизованных на определенных носителях антибиотиков.

6. Применение ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики – один из методов борьбы с устойчивым к антибиотикам формами микроорганизмов.

2. Сочетанное применение антибиотиков.

На 4 и 5 пункте необходимо остановиться подробнее. Применение антибиотиков в сочетании с другими соединениями повышает эффективность лечебного действия этих препаратов, а также препятствует быстрому возникновению и распространению резистентных форм микроорганизмов.

Использование антибиотиков в сочетании с сульфаниламидами, нитрофуранами, гормонами, а также с некоторыми другими биологически активными веществами (продигиозаном, лизоцимом, у-глобулином и др.) способствует повышению их физиологического действия. Эффективность антибиотиков в терапии повышается также при совместном применении их с ферментами, в частности с протеиназами.

Используется метод применения антибиотиков в сочетании с различными иммуномодуляторами (полисахариды микробного происхождения, гликолипиды, синтетические аналоги пептидогликанов и др.). При таком сочетании может наблюдаться как усиление, так и подавление иммунных реакций. Это зависит от природы иммуномодулятора, его дозы и времени введения.

При лечении стафилококковых заболеваний нередко антибиотики применяют совместно с соответствующим бактериофагом.

Значительное повышение эффективности антибиотикотерапии наблюдается при использовании комбинаций нескольких (чаще двух) антибиотиков, обладающих различными механизмами биологического действия.

В медицинской практике широко применяются сочетания пенициллина со стрептомицином (стрептомициллин), олеандомицина с тетрациклином (олететрин, сигмамицин), эритромицина с окситетрациклином (эрициклин), ампициллина с канамицином или гентамицином, гентамицина с левомицетином, тетрациклина с нистатином или леворином и др.

Комбинированные антибиотики применяют и в том случае, если препарат имеет высокую биологическую активность, но вызывает нежелательные побочные реакции. При одновременном применении нескольких антибиотиков наблюдаются четыре формы действия используемых комбинаций в отношении микроорганизмов: индифферентная, аддитивная, синергидная и антагонистическая.

Индифферентность. При совместном биологическом действии антибиотиков биохимический эффект каждого из них может проявляться независимо друг от друга.

Аддитивное действие. При комбинированном применении антибиотиков наблюдается суммарный эффект каждого из используемых препаратов (арифметическое сложение действия препаратов). При аддитивном характере действия антибиотики блокируют (нарушают) в цепи метаболизма чувствительного организма одни и те же реакции.

Синергидное действие. При совместном применении ряда антибиотиков происходит усиление antimикробного эффекта по сравнению с суммой биологических действий отдельно взятых препаратов. Синергидное действие антибиотиков проявляется в том случае, если препараты способны одновременно нарушать разные реакции метаболизма клетки (разные мишени) или если один из антибиотиков своим действием способствует проникновению в клетку другого

антибиотика. Синергизм антибиотиков может проявляться и в том случае, если заболевание вызвано двумя различными возбудителями, а каждый из применяемых антибиотиков подавляет развитие лишь одного определенного возбудителя.

Анtagонизм антибиотиков. Антибиотический эффект комбинаций препаратов может уменьшаться по сравнению с действием любого отдельно взятого антибиотика. Это может произойти в том случае, если один из компонентов раньше, чем другой, блокирует или подавляет одну из менее важных реакций общей цепи обмена веществ организма.

1. 16 Лекция № 19 (2 часа).

Тема: «Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков»

1.16.1 Вопросы лекции:

1. Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков

1.16.2 Краткое содержание вопросов:

1. Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков.

В настоящее время наиболее активно используется около 100 антибиотиков, а вместе с их производными (полусинтетические, комбинированные препараты) — более 200.

При назначении того или иного препарата следует добиваться максимального терапевтического эффекта при минимальном риске побочного действия. В этих целях учитываются индивидуальные режимы применения антибиотического вещества, в том числе доза препарата, кратность и пути введения антибиотика. Большое значение при этом имеет непрерывный контроль за концентрацией антибиотика в жидкостях и тканях больного. Для этого чаще стали применять высокоспецифичный, чувствительный и относительно простой иммуноферментный метод определения низких концентраций антибиотиков.

Широкое и активное применение антибиотиков в качестве химиотерапевтических веществ на протяжении более 50 лет способствовало накоплению экспериментального материала о побочных реакциях, вызываемых ими.

В ходе рассмотрения отдельных антибиотиков мы кратко останавливались на тех побочных реакциях, которые могут появиться при их применении в медицинской практике. Здесь рассмотрим обобщенные данные по некоторым негативным реакциям, которые наблюдаются при антибиотикотерапии.

И.А. Кассирский и Ю.И. Милевская еще в 1966 г. указали на три основные группы побочных реакций при применении антибиотиков: аллергические, токсические и обусловленные специфическим действием антибиотических веществ.

Аллергические реакции — наиболее частое проявление побочного действия антибиотиков. Эти реакции наблюдаются при применении практически всех антибиотиков. Однако чаще всего они возникают при применении антибиотиков пенициллиновой группы, так как в медицинской практике они самые распространенные.

Токсические реакции характерны для многих групп антибиотиков. Аминогликозиды (стрептомицин, неомицин, мономицин) обладают относительно высокой токсичностью. Такие антибиотики, как хлорамфеникол, группа ванкомицина — ристомицина и некоторые другие, проявляют токсическое

действие, связанное с кроветворением. Тетрациклические антибиотики, макролиды отличаются гепатоксическим действием.

Осложнения, связанные со *специфическим антимикробным действием антибиотиков*, происходят в результате нарушения равновесных экосистем организма человека. От этого зависят возникновение дисбактериозов и нарушение витаминного баланса организма, вторичные инфекции, вызываемые резистентными к антибиотикам формами возбудителей. Такие осложнения могут проявляться как у взрослых людей, так и у детей.

Так, тетрациклические антибиотики могут накапливаться в костях и нарушать их рост. Это особенно заметно проявляется у детей, длительное время принимавших указанные антибиотики. Хлорамфеникол и стрептомицин могут вызывать поражение костного мозга и нарушать процесс кроветворения (гипопластическая анемия). Противоопухолевые антибиотики из группы антрациклинов, в том числе адриамицин (доксирибуцин), вызывают нарушение генетического аппарата не пораженных опухолью клеток организма.

Антибиотики, подавляющие синтез нуклеиновых кислот или нарушающие энергетический метаболизм, обладают, как правило, широким набором побочных реакций.

Обобщая данные о токсичности используемых в медицинской практике антибиотиков, можно указать на следующие реакции: ототоксичность, нервно-мышечная блокада, неврологическая токсичность, нарушение функций крови, печени, желудочно-кишечного тракта и др.

Для уменьшения числа серьезных побочных реакций, вызываемых антибиотическими веществами, необходимо строго соблюдать оправдавшие себя основные принципы рационального применения антибиотиков, заменять препараты, обладающие токсичным действием, менее токсичными. Рациональная и безопасная антибиотикотерапия предусматривает всесторонний учет свойств антибиотических веществ, применяемых на практике, особенностей микроорганизма, вызывающего заболевание, и организма больного.

Основной путь предупреждения побочного действия антибиотиков связан с применением рациональной антибиотикотерапии, которая, по мнению Э.А. Бабаяна (1977), определяется тремя основными факторами: 1) выбором препарата с учетом его фармакологических свойств и спектра действия; 2) выделением, идентификацией и определением чувствительности бактериальной флоры к антибиотику; 3) выявлением или предупреждением повышенной чувствительности больных к выбранному антибиотику.

При применении антибиотиков необходимо учитывать индивидуальные особенности больного. Игнорирование этого важнейшего правила в отдельных случаях приводит к нежелательным последствиям, связанным с тяжелыми побочными явлениями.

1. 17 Лекция № 20-21 (4 часа).

Тема: «Основные этапы промышленного получения антибиотиков»

1.17.1 Вопросы лекции:

1. Общие сведения о производстве антибиотиков
2. Методы культивирования продуцентов антибиотиков
3. Сушка, контроль и расфасовка препарата
4. Актинофагия и ее значение в производстве антибиотиков

1.17.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общие сведения о производстве антибиотиков.

После установления высоких лечебных свойств первого антибиотика — пенициллина — сразу же возникла задача организации его производства в больших количествах. На первом этапе промышленное получение этого препарата носило примитивный, экономически нерентабельный характер. Выращивание продуцента антибиотика осуществлялось на средах, находящихся в небольших сосудах (матрацы, молочные бутылки, колбы и др.), при поверхностном культивировании гриба. Процесс развития гриба продолжался 8-10 сут. Такой способ культивирования гриба при большой затрате труда давал весьма низкий выход антибиотика, и себестоимость препарата была соответственно очень высокой. Безусловно, такое получение антибиотика не могло удовлетворить возрастающие запросы медицины. В результате поисков путей наиболее рационального способа производства антибиотика был предложен метод глубинного выращивания гриба в специальных емкостях — ферmentерах — при продувании воздуха и перемешивании культуральной жидкости.

Производство антибиотиков — хорошо развитая отрасль. В настоящее время она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. В ряде стран (США, Япония, Англия, Франция и др.) производство антибиотических веществ — одна из прибыльных отраслей химико-фармацевтической промышленности. Так, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сумму более 400 млн долларов.

Огромный спрос на антибиотические препараты со стороны медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности способствовал усиленному поиску новых антибиотиков и получению их в промышленных масштабах. Если в начале 40-х гг. XX в. мировая промышленность выпускала всего лишь 2-3 антибиотика, то теперь это число превышает 200.

Одновременно с ростом числа новых антибиотиков быстро росло промышленное производство ценных препаратов и снижалась их стоимость. Наша страна по производству антибиотиков до 1991 г. занимала одно из ведущих мест в мире.

Выпуск пенициллина в Советском Союзе был начат в 1944 г. на предприятиях химико-фармацевтической промышленности методом поверхностного культивирования гриба. Создание специализированных предприятий по промышленному производству пенициллина методом глубинного выращивания продуцента началось в стране в 1946-1948 гг. К 1957 г. у нас уже функционировали несколько крупных специализированных предприятий, которые производили пенициллин, стрептомицин, тетрациклин, хлортетрациклин.

Несмотря на огромные послевоенные экономические трудности, руководство нашей страны организовало ряд специализированных научных учреждений, в том числе Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Институт по изысканию новых антибиотиков АМН СССР (Москва), Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения (Ленинград), Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов и др.

Успехи антибиотической отрасли промышленности и качество выпускаемой продукции определяются уровнем основных стадий технологического процесса. Современное промышленное получение антибиотиков — это сложная многоступенчатая биотехнологическая система, состоящая из ряда последовательных стадий.

1. Стадия биосинтеза (образования) антибиотика. Это основная биологическая стадия сложного процесса получения антибиотического вещества.

Главная задача на этой стадии — создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика.

Высокая результативность стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента антибиотика, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма, в том числе стоимости применяемых предшественников, а также общих энергетических затрат на процессы, связанные с развитием продуцента антибиотического вещества.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающий подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования организма. Весь этот комплекс мер включается в понятие управляемый биосинтез.

В промышленных условиях управляемый биосинтез требует строгого соблюдения технологического процесса как на этапе подготовки инокулята, так и на стадии биосинтеза. При подготовке инокулята особое внимание обращают на состав среды, на которой выращивается организм, на возраст клеток или мицелия. На стадии биосинтеза кроме состава среды большую роль играют скорость потребления тех или иных ее компонентов, предшественники, регуляция процесса аэрации культуры, поддержание соответствующих температуры и рН среды и другие показатели режима культивирования.

2. Стадия предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделения культуральной жидкости от биомассы продуцента). Эффективность стадии во многом определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

3. Стадия выделения и очистки антибиотика. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и основного места накопления антибиотического вещества применяются различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используются экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка.

4. Особенность этой технологической стадии определяется тем, что на первом этапе работы приходится иметь дело с небольшой концентрацией (не более 1%) антибиотика в обрабатываемом растворе, тогда как на последующих этапах его концентрация увеличивается до 20-30%. Все это требует применения различных емкостей и объемов используемых реагентов.

5. Стадия получения готовой продукции, изготовление лекарственных форм, расфасовка. Особенность стадии определяется очень высокими требованиями к качеству конечного продукта. При химической очистке антибиотических веществ необходимо соблюдать безукоризненную чистоту помещений, оборудования, проводить их систематическую дезинфекцию. В случае выпуска антибиотиков, предназначенных для инъекций, препараты должны быть стерильными; получение таких антибиотических препаратов, приготовление различных лекарственных форм, дозировку (расфасовку) и упаковку следует проводить в асептических условиях. Расфасовка должна соответствовать запросам медицинских работников, связанным с удобством применения антибиотиков на практике.

В условиях промышленного производства антибиотиков принимают меры к максимальному снижению себестоимости препаратов путем интенсификации всех стадий технологического процесса, и прежде всего повышения эффективности первой стадии биосинтеза антибиотического вещества. Для этого необходимо:

а) внедрение в производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов — продуцентов антибиотиков;

б) создание и обеспечение самых благоприятных условий развития продуцента антибиотика на относительно дешевых средах;

в) широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и электронно-вычислительной техники в целях оптимизации и моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;

г) применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с автоматизированными контролирующими устройствами основных параметров развития организма и стадий биосинтеза антибиотика.

Вместе с этим необходимы повышение качества выпускаемых антибиотиков, их стандартизация.

2. Методы культивирования продуцентов антибиотиков.

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов — продуцентов антибиотиков или других биологически активных соединений признан метод глубинного культивирования. Метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух и среда перемешивается.

Существует четыре основные модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов.

1. *Периодическое культивирование*. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере, после чего ферментер освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засевается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.

2. *Отъемный метод*. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферmentерах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости (от 30 до 60% общего объема). При этом объем культуральной жидкости в ферментере доводится свежей питательной средой до исходного уровня.

3. *Батарейный способ*. Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментера во второй, затем из второго — в третий и т.д. Освобожденный ферментер немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов емкости используются более рационально.

4. *Непрерывное культивирование*. Метод принципиально отличен от указанных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков. В основе метода лежит принцип непрерывного протока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика или другого биологически активного соединения.

3. Сушка, контроль и расфасовка препарата.

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить, т.е. удалить из препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, не изменяющие цвета препарата. На этапе промышленного получения антибиотиков используют следующие методы обезвоживания.

Лиофильная сушка антибиотиков — широко распространенный прием; проводится при сравнительно низких температурах (от -8 до -12 °C).

Высушивание с применением распылительной сушилки — прогрессивный метод при работе с большими количествами антибиотика; раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагревого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков занимает несколько секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют свойств.

Метод взвешенного слоя или сушка в вакуум-сушильных шкафах применяется для высушивания зернистых и пастообразных антибиотических препаратов.

Контроль препарата. Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю: биологическому и фармакологическому. При биологическом контроле ставится задача выяснения стерильности готового препарата. Для этого обычно используют два метода.

Первый связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду.

Второй метод выяснения стерильности антибиотиков определяется тем, что для большинства этих соединений не имеется инактиваторов их биологической активности. Поэтому выявляют устойчивые к изучаемым препаратам формы микроорганизмов и определяют возможное присутствие в таких препаратах чувствительной к ним микрофлоры, для чего раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,75 мкм.

Необходимо подчеркнуть, что стерильность готового антибиотика обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки препарата.

Фармакологический контроль. К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие свойства, жизненно важные для организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на кровь, центральную нервную систему, дыхание и т.д.). Показатели острой токсичности — один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD_{50}), и смертельную дозу (LD_{100}). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Расфасовка и упаковка антибиотика — завершающий этап работы. Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Обобщая весь многостадийный и многоступенчатый процесс получения антибиотика, можно отметить, что он включает четыре основные стадии.

I стадия — получение соответствующего штамма — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства.

II стадия непосредственно связана с процессом биосинтеза антибиотика.

III стадия — это процессы выделения и очистки образовавшегося в ходе биосинтеза антибиотика.

IV стадия включает операции, связанные с концентрацией антибиотика, его стабилизацией и получением готового продукта.

Важно подчеркнуть, что на всех стадиях получения антибиотика должна строго соблюдаться технологическая дисциплина, все процессы должны осуществляться только в стерильных условиях.

Строгое соблюдение технологического процесса на II стадии обеспечивает возможность максимального биосинтеза антибиотика и наибольший выход конечного продукта. Особое внимание должно быть обращено на III стадию, связанную с выделением и очисткой антибиотика. При нарушении технологической дисциплины и использовании не соответствующего тем или иным операциям оборудования или его неисправности происходят большие потери антибиотика, которые могут нанести предприятию существенный экономический урон.

4. Актинофагия и ее значение в производстве антибиотиков.

В природе широко распространены фаги, вызывающие лизис бактерий, или бактериофаги. Они довольно легко обнаруживаются в разных типах почв. Наибольшее количество их выделяется из черноземной, перегнойной и подзолистой почв.

Бактериофаги способны лизировать только молодую, активно развивающуюся культуру микроорганизма. Технологический процесс получения антибиотиков весьма благоприятен для развития фагов в случае попадания их в ферментеры. При заражении культуры фагом происходит почти полный лизис мицелия стрептомицета и резкое снижение биосинтеза антибиотика. Лизис стрептомицетов под действием фагов в заводских условиях причиняет значительный материальный ущерб. Фаголизис стрептомицетов — продуцентов антибиотиков наблюдается при промышленном получении стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина, новобиоцина. Он может иметь место и при производстве других антибиотических веществ.

Активность фага зависит от особенностей микроорганизма, состава среды культивирования продуцента и стадии развития организма.

Среди разнообразных видов стрептомицетов, выделенных из почв, встречаются культуры, содержащие в себе фаг, т.е. лизогенные. Один из возможных путей попадания фага при производстве антибиотика — занос его самим продуцентом. Лизогенная культура устойчива к носимому ею фагу, поэтому освобождаемый культурой фаг обычно не находит условий для массового размножения. Однако в отдельных случаях из лизогенных культур стрептомицетов выделяются актинофаги, способные лизировать культуру хозяина. По-видимому, это следствие того, что некоторые симбиотические фаги сравнительно легко изменяют свои липидические свойства и становятся вирулентными по отношению к культуре хозяина. Следовательно, создаются условия для массового размножения видоизмененного фага, а это, в свою очередь, способствует накоплению фага в воздухе и на предметах оборудования производственных помещений, что может приводить к заражению фагом ферментеров.

Таким образом, инфицирование фагом может происходить путем внесения фага как одновременно с микроорганизмом (при наличии лизогенных форм), так и на определенных этапах производственного процесса получения антибиотика.

Исходя из изложенного для борьбы с фаговой инфекцией должны применяться следующие меры.

1. Выведение высокоактивных фагоустойчивых штаммов — продуцентов антибиотиков.
2. Борьба с распространением фага в производственных цехах и лабораториях.
3. Защита производственной культуры от фаговой инфекции.

Селекция фагоустойчивых штаммов бактерий основана на том, что под влиянием фагов у микроорганизма может возникнуть множество вариантов с различными свойствами, в том числе и варианты, обладающие фагоустойчивостью.

Метод получения фагоустойчивых штаммов состоит в следующем. На поверхность агаровой пластинки, содержащей фаг, высевают стрептомицет. В этих условиях вырастут лишь отдельные фагоустойчивые колонии. При отборе фагоустойчивых вариантов необходимо иметь в виду, что отдельные формы могут быть лизогенными, т.е. содержать фаг. Такие варианты при всех остальных положительных оценках не могут быть рекомендованы для производственных целей.

Большинство фагов, выделенных из почвы, — полифаги, т.е. способны лизировать от 45 до 90% культур стрептомицетов разных видов.

Для борьбы с распространением фага в производственных помещениях рекомендуется систематическая обработка стен, оборудования и пола заводских помещений дезинфицирующими средствами, убивающими фаг (гипохлориды, соли хлорноватистой кислоты и др.). Лизис культуры под действием фага при выращивании стрептомицета в ферментерах можно предотвратить добавлением к среде цитратов, оксалатов. Защита производственной культуры от фаговой инфекции осуществляется путем тщательной стерилизации сред, аппаратуры, оборудования и коммуникаций, строгого соблюдения стерильности на всех производственных этапах.

1. 18 Лекция № 22 (2 часа).

Тема: «Антибиотики в пищевой промышленности»

1.18.1 Вопросы лекции:

1. Антибиотики в пищевой промышленности
2. Антибиотики в консервной промышленности

1.18.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотики в пищевой промышленности.

Сохранение скоропортящихся продуктов питания — одна из важнейших проблем пищевой и консервной промышленности. Различные методы сохранения продуктов (консервирование, сквашивание, кипячение, замораживание и охлаждение) применялись человеком издавна. Эти методы широко используются и теперь.

Однако известно, что при кипячении, консервировании, сквашивании и в меньшей мере при охлаждении и замораживании продуктов питания изменяются их полезные свойства, особенно аромат, структура, питательная ценность и др. Порча пищевых продуктов при хранении может вызываться развитием микроорганизмов (мицелиальных грибов, дрожжей, бактерий), действием ферментов и влиянием окислительных процессов, стимулируемых кислородом воздуха.

Наибольшую роль в порче продуктов играют микроорганизмы, выделяющие разнообразные продукты обмена, из которых многие или нарушают качество продуктов, или делают их совершенно непригодными для употребления в результате образования сильных ядов (ботулин и др.). Таким образом, борьба с микроорганизмами,участвующими в порче продуктов питания, — одна из основных задач создания рациональных методов сохранения этих продуктов без изменения их качества и свойств.

Для борьбы с вредной микрофлорой используются разнообразные физические и химические методы. К числу физических методов уничтожения микроорганизмов относятся: термическая обработка (автоклавирование,

пастеризация и др.), замораживание, действие ультрафиолетовых и рентгеновских излучений и др. При химических методах борьбы с микробами, вызывающими порчу продуктов, применяются различные бактериостатические или бактерицидные вещества (сернистый ангидрид, бензойная кислота, сорбиновая кислота и др.).

2. Антибиотики в консервной промышленности.

Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленности относятся к 1943 г. К таким антибиотикам относят субтилин, низин и некоторые другие. Фитонциды высших растений также нередко используются при консервировании ряда продуктов питания.

Антибиотические вещества применяют в консервной промышленности, при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы, при хранении сыра и молочных продуктов, фруктов и овощей.

Известно, что при консервировании продуктов питания стерилизация — один из самых важных этапов технологии этого процесса. Продолжительность действия высоких температур при стерилизации зависит от вида продукта и сопутствующей микрофлоры. Под действием термической обработки погибает большинство видов микроорганизмов, но одновременно с этим происходит потеря некоторых ценных свойств продукта: разрушаются витамины, изменяются вкусовые качества и консистенция и т.п.

Применение антибиотиков при консервировании позволяет значительно снизить время термической обработки того или иного продукта. Так, для консервирования овощей предложено использовать субтилин. Применение этого антибиотика дает возможность проводить мягкую термическую обработку. Под действием субтилина гибнут клостридиальные и термофильные бактерии, устойчивые к нагреванию.

Хорошие результаты получены при использовании в консервной промышленности низина — антибиотика, образуемого молочнокислым стрептококком. Этот антибиотик в медицинской практике не употребляется. Его применяют при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты, мяса, рыбы, молока, сыров и других продуктов. Низин подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на человека. Применение низина при консервировании позволяет уменьшить продолжительность термической обработки продуктов в 2 раза.

Этот препарат используется также при сохранении алкогольных напитков, и прежде всего пива.

Антибиотические вещества высших растений (лука, моркови, лаврового листа, кориандра, перца красного, можжевеловых ягод и др.) значительно снижают количество спор микроорганизмов в консервируемой массе. Использование этих веществ при консервировании мясных и рыбных продуктов, различных овощей способствует уменьшению времени термической обработки и повышает качество продуктов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

Тема: «Понятие об антибиотиках»

2.1.1 Цель работы: ознакомиться с историей развития антибиотиков.

2.1.2 Задачи работы:

1. Познакомиться с различными определениями понятия «антибиотик»
2. Выяснить отличие антибиотических веществ от других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.
3. Изучить единицы биологической активности антибиотиков
4. Изучить антибиотическую продуктивность организмов

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Единицы биологической активности антибиотиков»
2. Методическое указание «Антибиотическая продуктивность организмов»

2.1.4 Описание (ход) работы:

1. Познакомиться с различными определениями понятия «антибиотик»

После открытия в 1940 г. ценного лекарственного препарата пенициллина в науку и в повседневную жизнь людей прочно вошло понятие «антибиотик», или «антибиотическое вещество». Впервые термин «антибиотик» ввел в 1942 г. З. Ваксман. Несмотря на несовершенство этого термина («антибиотик» в переводе означает «против жизни»), в настоящее время его невозможно оспорить или заменить другим.

Вместе с тем за сравнительно небольшую историю существования понятия «антибиотик» оно трактовалось разными авторами по-разному. Так, З. Ваксман в 40-х и 60-х гг. писал, что антибиотики — это химические вещества, образуемые микроорганизмами, обладающие способностью подавлять рост или даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы. Анализируя это определение понятия «антибиотик», можно заметить, что, с одной стороны, оно не показывает различий между антибиотическими веществами и другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, которые также обладают антимикробными свойствами, но не относятся к антибиотикам. Никто, например, не относит к антибиотикам молочную и лимонную кислоты, образуемые в процессе жизнедеятельности соответственно лактобактериями и *Aspergillus niger* и подавляющие развитие других микроорганизмов. К числу антибиотических веществ не может быть отнесен также аммиак, выделяемый уробактериями при развитии их на мочевине и препятствующий росту ряда других бактерий.

С другой стороны, вышеупомянутое определение понятия «антибиотики» включает в число производителей этих веществ только микроорганизмы, хотя хорошо известно, что к антибиотическим веществам относятся продукты жизнедеятельности высших растений (аллицин, выделенный из чеснока; берберин — из лютиковых и барбарисовых растений; гессипол — из семян хлопчатника мохнатого, и др.) и животных (эммолин, полученный из рыб; эритрин — из эритроцитов крови, печени и плаценты; скваламин — из акулы катран, и другие вещества). Таким образом, определение понятия «антибиотик», данное З. Ваксманом, не удовлетворяет современному представлению об этих биологически активных веществах.

М.М. Шемякин, А.С. Хохлов и др. (1961) дают следующее определение понятия «антибиотик»: «Антибиотическими веществами (антибиотиками) следует называть все продукты обмена любых организмов, способные избирательно подавлять или убивать микроорганизмы (бактерии, грибы, вирусы и др.)». Приведенное определение отличается от определения, данного З. Ваксманом, тем, что здесь указаны «продукты обмена любых организмов». Это, конечно, большое отличие. Однако по другим позициям оно совпадает с ваксмановским определением.

Близкое к этому определение понятия «антибиотик» было сделано З.В. Ермольевой в 1968 г.: «Антибиотики — вещества природного происхождения, обладающие выраженной биологической активностью. Они могут быть получены из микробов, растений, животных тканей и синтетическим путем».

Другие авторы дают слишком расширенное толкование этого понятия, рассматривая антибиотик как частный случай выделения фитонцидов в растительном мире или включая в число антибиотиков вещества, синтезируемые химическим путем и обладающие антимикробными свойствами. Таких соединений синтезируется очень много, однако причислять их к антибиотикам совершенно неправильно.

В конце 70-х — начале 80-х гг. XX столетия были открыты и внедрены в медицинскую практику фторхинолоны, синтезированные химическим методом и обладающие широким спектром антибактериального действия. Фторхинолоны представляют собой фторсодержащие производные хинолонкарбоновых кислот. Эту группу соединений, играющих большую роль в медицинской практике, а также недавно полученный новый класс оксазолидинонов, активных в отношении грамположительных и анаэробных бактерий, некоторые авторы причисляют к антибиотикам, с чем решительно нельзя согласиться.

К антибактериальным веществам относят и сульфаниламиды, нитрофураны, различные антисептики (препараты, используемые для уничтожения микроорганизмов в (на) живых тканях), дезинфицирующие вещества, применяемые для подавления микроорганизмов вне живого организма (обработка инструментов, оборудования и др.). Однако имеется принципиальное различие между антибиотиками, подавляющими развитие бактерий, и другими вышенназванными антибактериальными соединениями. Оно состоит в том, что первые — это специфические продукты биосинтеза организмов, а вторые образуются в результате химического синтеза. Поэтому относить последние к антибиотикам также нелогично и неверно.

Третий авторы значительно сужают это понятие, относя к антибиотикам лишь химиотерапевтические вещества, полученные из микроорганизмов или иных природных источников, а также их синтетические аналоги и производные, способные избирательно подавлять в организме больного возбудителей заболеваний и (или) задерживать развитие злокачественных новообразований.

Следуя этому определению, к антибиотикам можно отнести лишь около 200 соединений. С таким представлением об антибиотиках тоже нельзя согласиться.

Итак, что же такое антибиотики? Мы предлагаем следующее определение. Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, протозоя) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие развитие.

2. Выяснить отличие антибиотических веществ от других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По сравнению с некоторыми другими продуктами жизнедеятельности специфичность антибиотиков характеризуется тремя основными признаками.

Во-первых, антибиотики в отличие от органических кислот, спиртов и им подобных соединений, способных также подавлять рост микроорганизмов, обладают высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов. Это означает, что антибиотические вещества даже в очень низких концентрациях проявляют высокий физиологический эффект.

Во-вторых, характерная особенность антибиотических веществ — избирательность их действия. Это означает, что каждый антибиотик проявляет свое биологическое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определенным организмам или группам организмов, не оказывая при этом заметного эффекта на другие формы живых существ.

В-третьих, некоторые антибиотики наряду с антибактериальными свойствами могут проявлять иммуномодуляторное действие или выступать в качестве ингибиторов ферментов, инактивирующих практически значимые антибиотические вещества.

Антибиотические вещества в процессе развития их продуцентов могут выделяться в окружающую организм среду и накапливаться в ней, могут образовываться и накапливаться внутри клеток организма и освобождаться от них в результате экстракции или при разрушении клеток.

Образование антибиотиков — это наследственно закрепленная особенность метаболизма организмов. Так, продуцент новобиоцина *Streptomyces sphaeroides* может синтезировать новобиоцин или (и) биологически неактивные его аналоги (изоновобиоцин и дескарбамилновобиоцин) и ничего другого, какие бы условия для развития стрептомицета ни создавались.

Итак, антибиотики — не промежуточные продукты обмена веществ организмов (метаболиты), а конечные продукты обмена, накапливающиеся внутри клетки или выделяющиеся в окружающую среду.

Образование антибиотических веществ микроорганизмами — лишь одна из форм микробного antagonизма. Этот важный биологический процесс — не случайное явление, наблюдаемое только при лабораторном культивировании организмов. Биосинтез антибиотических веществ — специфическая особенность вида или даже штамма микроорганизмов, возникшая в результате их эволюционного развития как одна из приспособительных особенностей.

О том, что антибиотики — не случайные продукты обмена для их продуцентов, свидетельствует и тот факт, что эти мощные биологически активные соединения не убивают и не подавляют рост собственных продуцентов в тех концентрациях, в которых они образуются. Даже в промышленных условиях развитие продуцента с образованием больших количеств антибиотика заметно не подавляет жизнедеятельность собственного продуцента. Это обусловлено тем, что в ходе эволюции наряду с возникновением процесса образования антибиотика организмы, их продуцирующие, выработали и соответствующие механизмы защиты от действия собственных антибиотиков.

Несмотря на то что антибиотики образуются в малых количествах по сравнению с такими продуктами жизнедеятельности, как органические кислоты или спирты, они являются наиболее физиологически активными продуктами метаболизма. Все эти особенности антибиотиков позволяют выделить их в самостоятельную группу соединений.

3. Изучить единицы биологической активности антибиотиков.

Величины биологической активности антибиотиков (противобактериальной, антифунгальной и др.) обычно выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл раствора (ед./мл) или в 1 мг препарата (ед./мг). За единицу антибиотической активности принимают минимальное количество антибиотика, способное подавить

развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микroба в единице объема питательной среды.

За единицу антибиотической активности бензилпенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона. Для стрептомицина единица активности будет иной: минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

После того как многие антибиотики были получены в химически чистом виде, появилась возможность для ряда из них выразить условные единицы биологической активности в единицах массы. Установлено, например, что 1 мг чистого основания стрептомицина эквивалентен 1000 ед. биологической активности. Следовательно, 1 ед. активности стрептомицина эквивалентна 1 мкг чистого основания данного антибиотика. В связи с этим в настоящее время в большинстве случаев количество стрептомицина выражают в мкг/мг или в мкг/мл. Чем ближе число мкг/мг в препаратах стрептомицина к 1000, тем, следовательно, чище данный препарат, т.е. меньше содержит балластных веществ.

У таких антибиотиков, как карбомицин, эритромицин, новобиоцин, нистатин, трихотецин и некоторые другие, 1 ед. активности эквивалентна или приблизительно эквивалентна 1 мкг вещества. Однако у ряда антибиотиков единица биологической активности значительно отличается от 1 мкг вещества.

Например, 1 мг чистого основания неомицина содержит 300 ед. активности, поэтому 1 ед. активности данного антибиотика эквивалентна 3,3 мкг. Для бензилпенициллина (пенициллин С) 1 ед. активности эквивалентна примерно 0,59 мкг, так как 1 мг антибиотика содержит 1667 ед. (оксфордских). Для фумагиллина за единицу фагоцидного действия принято брать 0,1 мкг чистого вещества. 1 ед. бацитрацина эквивалентна 20 мкг вещества.

4. Изучить антибиотическую продуктивность организмов.

При изучении условий образования антибиотиков и исследовании влияния различных факторов среды на биосинтез антибиотиков важным критерием оценки их активности служит характеристика антибиотической продуктивности организма.

Иногда изменение одного или нескольких факторов среды приводит к значительному повышению процесса биосинтеза антибиотика, но существенно не влияет на увеличение биомассы организма. В других случаях, наоборот, при изменении условий культивирования резко увеличивается накопление биомассы организма, не сопровождающееся заметным повышением выхода антибиотика. Наконец, наблюдаются случаи, когда увеличение выхода антибиотика связано с увеличением количества образовавшейся биомассы. Поэтому для определения фактора, повышающего биосинтез антибиотика в культуре, необходимо в ходе развития организма выяснить его антибиотическую продуктивность.

Антибиотической продуктивностью организма называется количество антибиотика (в мкг или единицах), образованное 1мг сухих клеток (или мицелия) изучаемого организма за определенный промежуток времени (1ч). Антибиотическая продуктивность организма выражается в мкг/(мг·ч) или в ед.)/(мг·ч).

2.2 Лабораторная работа № 2-3 (4 часа).

Тема: «Классификация антибиотиков»

2.2.1 Цель работы: ознакомиться с классификацией антибиотиков

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить классификацию антибиотиков по биологическому происхождению

2. Изучить классификацию антибиотиков по механизму биологического действия
3. Изучить классификацию антибиотиков по спектру биологического действия
4. Изучить классификацию антибиотиков по химическому строению

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Классификация антибиотиков»

2.2.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить классификацию антибиотиков по биологическому происхождению.

1. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, относящимися к эубактериям.

A) Образуемые представителями рода *Pseudomonas*:

пиоцианин — *Ps. aeruginosa*,

вискозин — *Ps. viscosa*.

B) Образуемые представителями родов *Miccosoccus*, *Streptococcus*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Proteus*:

лизин — *Str. lactis*,

дипломицин — *Diplococcus*

продигиозин — *Chromobacterium prodigiosum*

колиформин — *E.coli*

протаптины — *Ps. vulgaris*

B) Образуемые бактериями родов *Bacillus*:

грамицидины — *B. brevis*,

субтилин — *B. subtilis*,

полимиксины — *B. polymyxa*.

2) Антибиотики, образуемые микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Actinomycetales*:

A) Образуемые представителями рода *Streptomyces*:

стрептомицин — *S. griseus*,

тетрациклины — *S. aureofaciens*, *Str. rimosus*,

новобиоцин — *S. sphaeroides*,

актиномицины — *S. antibioticus* и др.;

B) Образуемые представителями рода *Nocardia*:

рифамицины — *N. mediterranei*,

ристомицин — *N. fructiferi* и др.;

Г) Образуемые родом *Actinomadura*:

карминомицин — *A. carminata* и др.;

Д) Продуцируемые родом *Micromonospora*:

фортимицины — *M. olivoasterospora*,

гентамицины — *M. rugrigea*,

сизомицин — *M. inyoensis*.

3) Антибиотики, образуемые цианобактериями:

малинголид — *Lyngbya majuscula*.

4) Антибиотики, образуемые грибами, относящимися к классам базидиомицетов и аскомицетов:

термофиллин — базидиомицет *Lenzites sepiaria*,

лензитин — *Lenzites sepiaria*,

хетомин — *Chaetomium cochloides* (аскомицет).

5) Антибиотики, образуемые лишайниками, водорослями и низшими растениями:

усниновая кислота (бинан) — *Usnea florida*(лишайник),

хлореллин — *Chlorella vulgaris* (водоросль).

- 6) Антибиотики, образуемые высшими растениями:
аллицин — Allium sativum,
госсипол — Cossypolum,
фитоалексины: пизатин — Pisum sativum (горох), фазеолин — Phaseolus vulgaris (фасоль).
- 7) Антибиотики животного происхождения:
дефензины, скваламин, экмолин, круцин, интерферон.

2. Изучить классификацию антибиотиков по механизму биологического действия.

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин, D-циклосерин).
2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, аскозин, грамицидины, кандицидины, нистатин, трихомицин, эндомицин и др.).
3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот:
 - а) РНК (актиномицин, гризофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомицин и др.);
 - б) ДНК (актидион, брунеомицин, митомицины, новобиоцин, саркомицин, эдеин и др.).
4. Антибиотики — ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).
5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрицин, биомицин, аминогликозиды, метимицин, эритромицин, тетрацик-лины, хлорамфеникол и др.).
6. Антибиотики — ингибиторы дыхания (антимицины, олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.).
7. Антибиотики — ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин, тироцидин и др.).
8. Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами (пуромицин, хадацидин, О-циклосерин, ацидомицин и др.)
9. Антибиотики-иммуномодуляторы (циклоспорины, актино-мицины С и О, оливомицин, брунеомицин, рубомицин, спергуалин и др.).

3. Изучить классификацию антибиотиков по спектру биологического действия.

Условно все важнейшие в практическом отношении антибиотики можно разделить на несколько групп.

1. Противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении грамположительных организмов.

Группа пенициллина и цефалоспорина.

Биосинтетические пенициллины: бензилпенициллин и его соли (калиевая, натриевая, новокаиновая), бициллин, феноксиметилпенициллин.

Полусинтетические пенициллины.

Кислотоустойчивые, неактивные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: пропициллин, фенетициллин.

Кислотоустойчивые, активные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин.

Полусинтетические цефалоспорины: цефалоридин, цефалотин, цефалоглицин, цефалексин.

Бацитрацин.

Ванкомицин, ристомицин.

Линкомицин.

Новобиоцин.

Макролиды: эритромицин, олеандомицин, карбомицин,

спирамицин, лейкомицин, тилозин.

Фузидин.

2. Противобактериальные антибиотики широкого спектра действия.

Тетрациклины биосинтетические: хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин, деметилхлортетрациклин, деметилтетрациклин.

Полусинтетические тетрациклины: метациклин, доксициклин, моноциклин.

Хлорамфеникол (левомицетин).

Аминогликозиды: стрептомицин, неомицины, канамицин, гентамицин, фортимицины, тобрамицин.

Полимиксины, колистин.

Грамицидин С.

Полусинтетические пенициллины: ампициллин, карбенициллин.

3. Противотуберкулезные антибиотики.

Стрептомицин, канамицин, виомицин, циклосерин.

4. Противогрибные антибиотики.

Нистатин.

Гризофульвин.

Амфотерицин В.

Леворин.

Кандицин.

Трихотецин.

5. Противоопухолевые антибиотики.

Актиномицин С.

Митомицин С.

Оливомицин.

Брунеомицин.

Реумицин.

Адриамицин (доксорубицин).

Дауномицин, рубомицины.

6. Противоамебные и противомалярийные антибиотики.

Фумагиллин.

Радицикол.

4. Изучить классификацию антибиотиков по химическому строению.

1. Антибиотики ациклического строения (большинство полиеновые антибиотики).

2. Антибиотики алициклического строения

3. Тетрациклины

4. Ароматические антибиотики

5. Антибиотики-хиноны

6. Антибиотики- кислородсодержащие гетероциклические соединения

7. Антибиотики-олигомицины

8. Антибиотики-макролиды

9. Аминогликозидные антибиотики

10. Антибиотики – азотсодержащие гетероциклические соединения

11. Антибиотики-полипептиды

12. Антибиотики-депспептиды

13. Актиномицины

14. Стрепторицины

15. Металлсодержащие соединения

2.3 Лабораторная работа № 4 (2 часа).

Тема: «Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль»

2.3.1 Цель работы: изучить образование антибиотиков в природе и их биологическую роль.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов.

2. Выяснить биологическую роль антибиотиков в природе

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль»

2.3.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов.

Способность микроорганизмов образовывать антибиотические вещества изучается, как правило, в условиях искусственного их культивирования, в лабораторных опытах. Однако возникает вопрос: проявляется ли антагонизм, и особенно антагонизм, связанный с образованием антибиотиков, у микроорганизмов в условиях их естественного местообитания? Фактический материал дает возможность ответить на этот вопрос положительно.

Установлено, что бактерии семейства *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteria* и др., попадая в свежую морскую воду, гибнут в ней через несколько дней. Количество гноеродных стафилококков в свежей морской воде Черного моря через 10 дней уменьшается в 2-3 раза. В прокипяченной черноморской воде этот микроб заметно развивается. Аналогичные наблюдения получены и при изучении пресной воды.

Следовательно, в водоемах в результате жизнедеятельности различных организмов, характерных для этой среды, накапливаются вещества, препятствующие развитию многих видов микробов, попадающих в эти водоемы.

Наряду с биотическими факторами существенную роль в угнетении не свойственных этой среде микроорганизмов играют и абиотические факторы, такие, как концентрация солей и иных растворимых веществ, температура, отсутствие некоторых компонентов, необходимых для питания, и т.д.

Большое число исследований посвящено изучению возможностей образования антибиотических веществ в почвах — основном естественном местообитании большинства микроорганизмов.

Многие патогенные для человека и животных бактерии (кишечная, брюшнотифозная, дизентерийная палочки и др.), а также фитопатогенные грибы и бактерии, попадая в почву, быстро в ней погибают. Однако в стерильной почве те же самые организмы сохраняются в течение длительного времени. Иными словами, в почве наблюдаются те же явления, что и в водоемах. Различные патогенные бактерии, попадая в почву, сохраняются в ней неодинаковое время

Возбудитель туберкулеза свеклы *Xanthomonos beticola*, попадая в почву, погибает в ней через 3-10 дней, а из стерильной почвы этот организм выделяется в течение 32-60 дней.

Таким образом, в почвах и водоемах, т.е. основных естественных местах обитания микрофлоры, создаются условия, препятствующие развитию некоторых посторонних для этих почв видов микробов.

Связано это с тем, что, во-первых, в естественных условиях неблагоприятное влияние на постороннюю микрофлору оказывают физические и физико-химические (абиотические) факторы среды, в том числе температура, влажность,

pH, осмотическое давление и др. Во-вторых, наиболее существенную роль, по-видимому, играют биотические факторы: микро- и микрофлора, бактерии- и актинофаги, почвенные (водные) животные и растения, а также разнообразные продукты их жизнедеятельности, в том числе и вещества типа антибиотиков.

О возможности образования в почвах антибиотиков и проявления ими антибиотических свойств непосредственно в этих условиях существует два противоположных мнения.

Одни авторы считают, что антибиотики могут вырабатываться при развитии микроорганизмов непосредственно в почвах, где они проявляют свою биологическую активность. Другие исследователи полагают, что антибиотики не образуются в почве, а если и образуются, то их биологическая роль, по существу, сводится к нулю в результате того, что в почве антибиотики подвергаются быстрой деградации, они адсорбируются почвенными частицами и вступают в реакции с органическим веществом почвы.

Сторонники невозможности образования антибиотиков в почвах основывают свои выводы, в частности, и на том, что в почве якобы недостаточно питательных веществ, необходимых продуценту для активного развития и образования антибиотиков.

Изучение вопроса об образовании антибиотиков микроорганизмами в почве представляет ряд трудностей. Главные из них связаны с определением антибиотических веществ в почве: во-первых, антибиотики менее стабильны в почве, чем в других субстратах; во-вторых, многие из них, и в первую очередь антибиотики-основания, легко адсорбируются коллоидами почвы и инактивируются почвенным комплексом.

Поскольку к настоящему времени еще нет надежных методов определения антибиотиков в почве, довольно трудно разобраться в вопросе о том, образует ли в ней изучаемый организм антибиотическое вещество или нет. Пытаясь решить эту проблему, ряд исследователей, изучавших возможность образования антибиотиков в почвах, использовали стерильную почву с добавлением к ней разнообразных питательных веществ (глюкоза, пептон, рыбный экстракт, сахарная свекла, солома и др.). В результате удалось установить, что некоторые микроскопические грибы и стрептомицеты в этих условиях могут образовывать антибиотические вещества.

Однако при использовании стерильной почвы как субстрата с дополнительным внесением в нее разнообразных источников питания создаются совершенно иные условия, весьма далекие от естественных. Прежде всего при стерилизации почвы в ней убивается вся флора и фауна, в результате чего почва обогащается дополнительными веществами. Кроме того, в стерильной почве исключается всякая конкуренция за питательные вещества. Под действием высоких температур при стерилизации меняются коллоиды почвы. Одним словом, при стерилизации почва превращается в субстрат с новыми свойствами, только внешне похожий на почву. Поэтому опыты, в которых использовались простерилизованные почвы с добавлением к ним самых разнообразных питательных веществ, порой никогда не встречающихся в естественных условиях (например, рыбный экстракт, кукурузный экстракт и т.п.), не могут доказать способности или отсутствия таковой к образованию антибиотиков микроорганизмами в естественных почвах.

Действительно ли в естественной почве не хватает питательных веществ, необходимых для развития микроорганизмов и продуцирования антибиотиков?

Для ответа на этот вопрос были проведены специальные эксперименты. Из трех образцов почв, взятых в Ботаническом саду и на Звенигородской биологической станции МГУ, были выделены стрептомицеты и обычным методом отобраны наиболее активные штаммы. Штаммы-антагонисты поддерживались на агаризованной синтетической среде. Следовало выяснить возможность развития

выделенных штаммов стрептомицетов и образования ими антибиотиков при культивировании их только на веществах тех почв, из которых они были изолированы. С этой целью были проведены три серии опытов: 1) выращивание стрептомицетов на водных почвенных вытяжках, полученных по методу Виноградского; 2) культивирование изученных штаммов стрептомицетов на водной почвенной вытяжке с добавлением гуматов, выделенных из тех же почв; 3) культивирование стрептомицетов на поверхности агаровых блоков, приготовленных из выщелоченного агара и дистиллированной воды (агаровые блоки помещались на поверхности почвы, покрытой холстиной). Почва находилась в чашках Коха. Предполагалось, что вещества почвы будут диффундировать в толщу агаровых блоков и использоваться стрептомицетами, находящимися на их поверхностях.

Антибиотические свойства в первых двух случаях определялись методом диффузии в агар с использованием металлических цилиндров, в третьем — методом наложения кусочков агарового блока на поверхность агаровой пластинки, предварительно засеянной тест-организмом.

Во всех случаях использовалась «оживленная» почва, т.е. почва, которая выдерживалась в течение 48 ч в термостате при 26 °С и при достаточной влажности.

Результаты опытов показали, что почти все изучаемые штаммы стрептомицетов могут расти (хотя и не так обильно) и образовывать при этом антибиотики только на веществах почвы, без добавления дополнительных компонентов.

Таким образом, только на веществах почвы, в которой непрерывно происходят разнообразные биологические процессы, стрептомицеты, выделенные из этой же почвы, могут развиваться и образовывать антибиотические вещества.

Основной фактор инактивации антибиотиков в почве — ее микробиологический состав. Во-первых, микроорганизмы, синтезируя кислые или щелочные продукты, могут инактивировать отдельные антибиотические вещества, образующиеся в почве или попадающие туда извне. Во-вторых, почвенные микробы способны образовывать и выделять ферменты, инактивирующие антибиотики. Известно, что пенициллины, цефалоспорины, стрептомицин, хлорамфеникол, актиномицины и др. легко разрушаются ферментами, образуемыми многими видами сапрофитных почвенных бактерий.

В-третьих, исчезновение антибиотиков в почве может, по-видимому, происходить и в результате использования этих соединений микроорганизмами в качестве источников азота и углерода. Такое предположение основано на том, что почвенные бактерии из рода *Achromobacter* способны использовать стрептомицин в качестве единственного источника углерода и азота.

2. Выяснить биологическую роль антибиотиков в природе.

Имеются две противоположные концепции о биологической роли антибиотиков. Первая исходит из того, что образование антибиотиков следует рассматривать как специфическую особенность обмена веществ организмов, возникшую и закрепленную у них в процессе эволюционного развития. Образование и выделение антибиотиков в окружающую среду при жизни организмов или после их отмирания — могущественный фактор в борьбе за существование видов.

Биосинтез антибиотиков — наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ.

Вместе с тем известно, что одинаковые антибиотики могут образовываться различными видами организмов. И это нисколько не противоречит мысли о

наследственно закрепленном свойстве микроорганизмов продуцировать определенные антибиотические вещества.

Вторая концепция состоит в том, что антибиотические вещества, образуемые микроорганизмами, носят случайный характер, зависящий лишь от условий культивирования. По мнению З. Вакмана и некоторых других авторов, образование антибиотиков — это незакрепленное свойство организма, проявляющееся только при развитии организма в специфической среде и при наличии особых внешних условий. Поэтому антибиотики не имеют для производителей приспособительного значения, их образование не связано с эволюцией микроорганизмов. Эта точка зрения основывается на двух положениях.

1. Не все микроорганизмы образуют антибиотические вещества, что, однако, не мешает их широкому распространению в природе.

2. Антибиотические вещества, даже самые устойчивые, довольно быстро инактивируются в почве, в этом естественном местообитании большинства микроорганизмов. Только при максимальном насыщении почвы антибиотиками можно получить соответствующий биологический эффект.

Итак, приведенный выше фактический материал показывает, что антибиотики могут образовываться и образуются при развитии микроорганизмов в естественных местах их обитания (почва) без внесения туда дополнительных питательных веществ.

В зависимости от химического строения образовавшиеся в почве антибиотики способны сохраняться там определенное время и проявлять свое биологическое действие.

2.4 Лабораторная работа № 5-6 (4 часа).

Тема: «Антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании»

2.4.1 Цель работы: изучить антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить среды для культивирования микрорганизмов
2. Изучить количественное соотношение источников углерода и азота в среде
3. Изучить источники минерального питания и определить их роль в развитии микроорганизмов.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Антибиотические свойства микроорганизмов при лабораторном культивировании»

2.4.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить среды для культивирования микроорганизмов.

Понятие «среда для культивирования» включает не только определенный качественный и количественный состав компонентов или отдельных элементов, необходимых для конструктивного и энергетического обмена организма (источники азота, углерода, фосфора, ряда микроэлементов, витамины и ростовые вещества), но и физико-химические и физические факторы (активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, температура, аэрация и др.). Все эти факторы, взятые вместе и каждый в отдельности, играют существенную роль в развитии микроорганизма и в проявлении им отдельных физиологических и

биохимических функций. Обычно изменение одного из факторов среды влечет за собой изменение другого.

По характеристике состава все среды для культивирования микроорганизмов, используемые в микробиологической практике, можно разделить на две основные группы: натуральные среды неопределенного состава и синтетические среды, а по физическому состоянию — на три группы: твердые (приготовленные с агаром, желатиной или на кремниевых пластинках), жидкие и сыпучие (увлажненные отруби, зерно).

Натуральные среды неопределенного состава. Натуральными обычно называют среды, состоящие из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. В качестве природных соединений или продуктов, издавна используемых в микробиологии, применяют различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, фрукты и овощи, а также навоз, почву и т.д. Большинство из них используется в виде экстрактов или настоек.

Преимущество натуральных сред неопределенного состава заключается в том, что на них хорошо развиваются микроорганизмы большинства видов, поскольку в составе таких сред, как правило, имеются все компоненты, необходимые для роста и развития. Эти среды обычно содержат ряд аминокислот, некоторые витамины и другие ценные для роста микроорганизмов вещества, а также комплексообразующие соединения, способствующие связыванию микроэлементов и таким образом препятствующие их осаждению. Кроме того, эти среды легко приготовить, материал для них дешев и доступен.

Однако, среды с неопределенным составом малопригодны или почти не пригодны для изучения обмена веществ микробов: они не позволяют учесть потребление многих основных компонентов среды и выяснить, какие вещества образуются в ходе развития организма, и т.д. Такие среды используются для поддержания организмов, для накопления биомассы или для диагностических целей.

Мясопептонная среда, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном, имеющим сложный, до конца не определенный химический состав, входят поваренная соль, фосфорнокислый калий, иногда глюкоза или сахароза.

Картофельные среды с глюкозой и пептоном, часто используемые для культивирования многих видов стрептомицетов и бактерий.

Мясопептонные и картофельные среды используются преимущественно в лабораторной практике.

Среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами, в состав которых наряду с названными продуктами неопределенного состава входят (МН4)2804, CaCO₃, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иной углевод и ряд других соединений. Эти среды успешно применяются в промышленных условиях, так как они дешевы и обеспечивают хорошее развитие многих видов микроорганизмов с высоким выходом ценных продуктов жизнедеятельности, в том числе и антибиотиков.

Синтетические среды. Синтетическими называют такие среды для культивирования микроорганизмов, в состав которых входят определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Готовить синтетические среды следует только на дистиллированной воде.

Синтетические среды очень удобны для изучения обмена веществ микроорганизмов. Если известен точный состав входящих в среду компонентов и их количество, можно, наблюдая за динамикой развития культуры, изучить их потребление и различные превращения в соответствующие продукты обмена.

Для изучения процесса обмена веществ микроорганизмов наиболее всего подходят жидкие среды. Твердые (агаризованные) среды успешно используются для изучения цикла развития микроорганизма, архитектоники микробных колоний, диссоциации культур, для очистки культур от сопутствующих организмов и проверки чистоты популяции. Агаризованные среды можно широко применять во многих предварительных исследованиях. Такие среды часто употребляют для выделения микробов-антагонистов из почвы и других естественных субстратов.

Сыпучие среды применяются для сохранения и поддержания многих микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, в частности актиномицетов и плесневых грибов.

2. Изучить количественное соотношение источников углерода и азота в среде.

Важное значение для развития организмов и образования ими антибиотиков имеет количественное соотношение источников углерода и азота, содержащихся в среде.

Установлено, что для наиболее благоприятного развития микроорганизма в среде соотношение между углеродом и азотом должно быть примерно 20 : 1 (C: N = 20). Однако такое соотношение углерода и азота не всегда благоприятно для образования антибиотика. Далеко не во всех случаях биосинтез антибиотика происходит пропорционально накоплению биомассы микробы. Иногда при хорошем росте организма антибиотик не продуцируется или синтезируется в небольшом количестве. Поэтому для стимуляции образования организмом антибиотических веществ необходимо в каждом конкретном случае подбирать соответствующие соотношения углерода и азота в среде.

3. Изучить источники минерального питания и определить их роль в развитии микроорганизмов.

Жизнь микроорганизмов и их биохимическая активность во многом зависят от наличия в цитоплазме клеток и в окружающей среде неорганических соединений, содержащих такие элементы, как фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо, марганец, цинк, медь, молибден и др.

Макро- и микроэлементы играют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Многие из них входят в состав цитоплазмы микробной клетки в качестве составных частей некоторых ферментов, другие элементы выступают как компоненты, регулирующие осмотическое давление или изменяющие гидрофильность цитоплазмы клеток.

В золе микроорганизмов обнаружены фосфор, калий, магний, кальций, натрий, сера, железо, марганец, медь, цинк, бор, висмут и некоторые другие элементы. В расчете на массу сухого вещества фосфор составляет до 4,5%, калий — до 1,3, магний — до 0,5, кальций — до 0,8, натрий — до 1,0, сера — до 1,0, железо — до 0,2% и т.д. Однако присутствие того или иного элемента в золе микробы еще не указывает на то, что этот элемент действительно необходим ему. В золе могут обнаруживаться элементы, которые в процессе жизнедеятельности микробы адсорбировались на его поверхности. Вместе с тем точно установлено, что большинству указанных элементов принадлежит активная роль в биохимической деятельности микроорганизма.

2.5 Лабораторная работа № 7 (2 часа).

Тема: «Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества»

2.5.1 Цель работы: выяснить значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов.

2.5.2 Задачи работы:

1. Каково значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов?
2. Изучить основные механизмы защиты продуцентов от действия собственных продуцентов.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества»

2.5.4 Описание (ход) работы:

1. Каково значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов?

Известно, что в процессе жизнедеятельности организмов одни антибиотики (пенициллины, стрептомицин, тетрациклины и др.) в основном выделяются в среду, окружающую организм, другие (например, кандинцидин, ристомицин) выделяются в среду лишь частично, значительное же их количество находится в клетках продуцента; третья группа антибиотических веществ (грамицидины, эндомицин, римоцидин и др.) почти целиком связана с клетками продуцентов и в окружающую среду при жизни организма практически не выделяется. Понятно, что в указанных случаях роль антибиотика в жизнедеятельности организмов, их продуцирующих, неодинакова.

В процессе развития организмы приспособились к действию антибиотических веществ в тех концентрациях, в которых они их вырабатывают, но если концентрацию антибиотика в среде искусственно увеличить, то микроорганизм, образующий данный антибиотик, начинает реагировать на это. Так, некоторые стрептомицеты в присутствии определенных концентраций синтезируемых ими антибиотиков прекращают рост.

Более высокие концентрации антибиотиков начинают угнетать развитие собственных продуцентов.

Существует определенная взаимосвязь между образованием антибиотика и устойчивостью к нему продуцента этого антибиотика. Высокопродуктивные штаммы аминогликозидов находят, как правило, среди стрептомицетов, проявивших более высокую устойчивость к этим антибиотикам.

Различные штаммы *S. griseus* отличаются друг от друга по чувствительности к стрептомицину. Штаммы, способные продуцировать более высокие концентрации антибиотика, выдерживают присутствие в среде больших количеств стрептомицина; менее активные штаммы при тех же концентрациях антибиотика в среде не будут расти, и совсем не развиваются штаммы, не образующие стрептомицина.

Это свойство стрептомицетов было использовано для селекции наиболее продуктивных по образованию антибиотика штаммов *S. griseus*, так как добавление к среде определенных концентраций стрептомицина способствует развитию наиболее активных штаммов стрептомицета.

Организмы, продуцирующие антибиотики, устойчивы к их действию. Причем микроорганизмы, выделенные из природных источников («дикие» штаммы), имеющие невысокую биосинтетическую активность, резистентны к собственному антибиотику на уровне мембран. Высокопродуктивные мутанты микроорганизмов защищаются от антибиотиков, синтезируемых ими, в результате инактивации их ферментами или образования некоторых метаболитов (например, цистеина), инактивирующих собственные антибиотики, а также благодаря клеточным мембранам, препятствующим проникновению антибиотика в клетку, и генам устойчивости.

2. Изучить основные механизмы защиты продуцентов от действия собственных продуцентов.

Продуценты антибиотических веществ в процессе эволюции выработали механизмы защиты от действия образуемых ими мощных биологически активных продуктов жизнедеятельности. Вместе с тем антибиотики, находясь в клетках продуцента или вне их, могут оказывать определенное воздействие на процессы метаболизма собственного продуцента.

2.6 Лабораторная работа № 8-9 (4 часа).

Тема: «Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия»

2.6.1 Цель работы: ознакомиться с методами выделения продуцентов антибиотических веществ и методами определения их биологического действия.

2.6.2 Задачи работы:

1. Изучить методы выделения и очистки антибиотиков
2. Изучить антимикробный спектр и токсичность
3. Изучить лечебные свойства антибиотиков
4. Изучить лабораторный регламент

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое указание «Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия»

2.6.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить методы выделения и очистки антибиотиков.

Выделение антибиотиков и их очистка осуществляются разными способами, выбор которых зависит от химической природы антибиотика, характера сопутствующих антибиотику продуктов жизнедеятельности организма (органические кислоты, аминокислоты, пигменты и другие соединения), неиспользованных компонентов среды (углеводы, масла, азотсодержащие вещества, неорганические соли и др.), а также от того, где накапливается это вещество — в культуральной жидкости или в клетках продуцента.

Основная задача первых этапов выделения антибиотического вещества — концентрирование биологически активного соединения и очистка от сопутствующих балластных веществ.

Основными методами выделения антибиотиков из нативных растворов (культуральная жидкость, освобожденная от биологической массы продуцента) можно назвать следующие: осаждение антибиотика, методы экстракции органическими растворителями, сорбционные методы с использованием поверхностно-активных веществ (активированный уголь, активированный оксид алюминия и др.) или ионообменных материалов (ионообменные смолы). При использовании сорбционных методов выделения антибиотиков наиболее трудной является десорбция (элюирование) препарата. Выделение антибиотика из клеток продуцента осуществляют методом экстракции.

Антибиотик, выделенный одним из указанных способов, представляет собой лишь технически чистый препарат, который не может еще использоваться в медицинской практике. Дальнейшая очистка препарата осуществляется или путем повторной сорбции, перекристаллизации, растворения антибиотика в органических растворителях, или иными методами.

2. Изучить антимикробный спектр и токсичность.

После того как антибиотическое вещество с помощью того или иного метода выделено и хорошо очищено, оценивают его биологическую активность по отношению к широкому ряду микроорганизмов (проверяют широкий антимикробный спектр). Кроме того, антибиотик исследуют на стерильность, токсичность, пирогенность, испытывают в отношении действия на лейкоциты крови и определяют другие показатели.

Цель выяснения стерильности готового препарата — установление отсутствия в нем спор микроорганизмов, прежде всего патогенных. Для этого необходимо, если возможно, инактивировать антибиотическое вещество, а затем нанести его на разнообразные по составу питательные среды (мясопептонный бульон, печеночный бульон, кровяной агар и т.п.).

Пенициллин инактивируют с помощью фермента пенициллиназы (пенициллин-β-лактамазы) или пенициллинацилазы либо солянокислого гидроксиамина. Стрептомицин инактивируют при помощи гидроксиамина или цистеина.

Многие антибиотики не удается инактивировать, поэтому их стерильность оценивают лишь в отношении форм микроорганизмов, устойчивых к этим антибиотикам. Можно также пропускать антибиотик через мембранные фильтры, задерживающие клетки и споры бактерий, и прорачивать фильтры на агаровых пластинках.

Токсичность антибиотика проверяют на экспериментальных животных, которым в определенный период внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно или иными путями вводят различные дозы изучаемого антибиотика. За такими животными ведут тщательные наблюдения. При отсутствии внешних изменений в поведении животных в течение 12-15 сут. считают, что антибиотик не обладает заметными токсическими свойствами. Это, разумеется, первый и предварительный этап в изучении токсичности антибиотика. При более глубоком исследовании этого вопроса выясняют влияние препарата на отдельные ткани и органы животных.

Некоторым антибиотикам свойственна кумулятивная токсичность, которая при многократном применении препарата накапливается без каких-либо внешних проявлений, но в итоге приводит к сильному отравлению или, в крайнем случае, к гибели организма. Это скрытая токсичность, противоположная острой, проявляющейся сразу же после первого введения антибиотика.

Отсутствие местной и общей токсичности антибиотика, отсутствие пирогенности и угнетения деятельности лейкоцитов, сохранение антибиотической активности препарата в присутствии сыворотки крови, гноя и других веществ, необходимый спектр антимикробного действия дают основания для дальнейшего испытания изучаемого препарата как лечебного вещества.

Вместе с этим необходимо определить характер биологического действия антибиотика, иными словами, выяснить, является ли антибиотик бактериостатическим или бактерицидным. Знание характера действия препарата может создать первичное представление о механизме его антибактериальных свойств.

3. Изучить лечебные свойства антибиотиков.

Следующий этап изучения антибиотика — определение его фармакологических и терапевтических свойств.

Лечебные свойства антибиотиков проверяют на экспериментальных животных, зараженных соответствующей дозой определенного вида патогенного микробы. Обычно используют дозы инфекции с таким расчетом, чтобы вызвать гибель 50% (LD_{50}) или 100% животных (LD_{100}). LD_{50} — минимальная смертельная

доза. Животных делят на три группы. Одной группе антибиотик вводят сразу же после заражения; вторая группа подвергается обработке антибиотиком через некоторое время после заражения (через 5 ч или позже). Во всех случаях применяют максимальные дозы антибиотика, которые переносятся животными. Третья группа подопытных животных не подвергается обработке антибиотиком — это контроль.

По количеству выживших особей в опытных группах судят о терапевтической ценности изучаемого антибиотического вещества. Минимальное количество антибиотика, способствующее предохранению животного от смертельной дозы инфекции, составляет минимальную терапевтическую дозу. Вместе с тем отдельные антибиотические вещества, имеющие лечебные свойства, в определенных концентрациях токсичны по отношению к макроорганизму. Если лечебная доза антибиотика ниже токсичной, то такой препарат может быть использован в медицинской практике. Если терапевтическая доза равна токсичной или приближается к ней, то широкое применение такого антибиотика в лечебной практике не разрешается.

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.

4. Изучить 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.

Лабораторный регламент получения антибиотика включает следующие разделы.

1. Характеристика антибиотика. Включает название антибиотика, основное назначение, краткое описание свойств препарата, описание организма, образующего антибиотик, методы определения биологической активности, условия хранения.

2. Технологическая схема производства. В схеме указана последовательность работ по производству антибиотика с подразделением на стадии. Технологическая схема — основа будущей технологии промышленного получения препарата.

3. Сыре и материалы. Сообщаются требования, предъявляемые к качеству сырья и материалам, используемым при получении антибиотика в целях его максимального выхода и обеспечения повторяемости результатов. При этом необходимо ориентироваться на сырье и материалы, выпускаемые отечественной промышленностью.

4. Аппаратурная схема производства. Приводится схема процесса получения антибиотика с указанием аппаратов и приборов, их конструкции, размера и других характеристик, которые могут иметь значение при производстве антибиотика.

5. Изложение технологического процесса. Описывается процесс получения антибиотика на основе завершенных научных и экспериментальных исследований, выполненных в лабораторных условиях. Процесс включается в регламент в том случае, если удается получить воспроизводимые результаты по качеству антибиотика и по его выходу.

Технологический процесс описывают по стадиям. Подробно указываются объемы, концентрации веществ, входящих в среду, pH среды, степень аэрации, растворители, пеногасители, условия перемешивания, продолжительность процесса развития продуцента, температура и другие показатели.

6. Отходы производства, технологические и вентиляционные выбросы в атмосферу, их использование и обезвреживание. Приводится перечень возможных отходов и выбросов в атмосферу, указывается наличие в отходах ценных веществ, даются рекомендации к их использованию, а также список веществ, вредных с точки зрения загрязнения окружающей среды, и способы их обезвреживания.

7. Контроль производства. Указываются особые требования к оборудованию (герметичность ферментера и всех коммуникаций, исправность и надежность работы мешалки и т.д.). Приводятся анализ качества сырья, соответствующего определенным стандартам; режимы стерилизации сред и отдельных веществ, воздуха; методы анализа процесса биосинтеза антибиотика и готовой продукции.

8. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария. Даётся перечень веществ, способных воспламеняться и взрываться. Все вещества, применяемые в процессе получения антибиотика, должны быть изучены с позиций техники безопасности, пожарной опасности и производственной санитарии.

9. Перечень производственных инструкций. Приводятся все инструкции, которые должны быть разработаны на основе лабораторного регламента.

10. Технико-экономические нормативы. Указываются выходы конечного продукта и промежуточных продуктов; удельные нормы расхода сырья и материалов, удельные нормы технологических затрат (пара, воды, электроэнергии, сжатого воздуха).

11. Информационные материалы. В разделе должны быть указаны биологические и физико-химические свойства вещества, степень очистки, фармакологические свойства (преимущества и особенности), сравнение с показателями идентичных зарубежных препаратов, сведения о патентной чистоте антибиотика и методе его получения с перечислением охраняющих авторских свидетельств (патентов), ведения о вредности веществ, применяемых при получении препарата, и мерах предосторожности при работе с ними.

2.7 Лабораторная работа № 10 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, образуемые бактериями»

2.7.1 Цель работы: изучить антибиотики, образуемые бактериями.

2.7.2 Задачи работы:

1. Изучить гомопептидные соединения
2. Изучить гетеромерные пептиды
3. Изучить высокомолекулярные пептиды

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, образуемые бактериями»

2.7.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить гомопептидные соединения.

В эту подгруппу входят тиротрицин, грамицидины и бацитрацины. **Тиротрицин** впервые был получен Р. Дюбо в 1939 г. при развитии бактерии *Bacillus brevis*, выделенной из почвы. Продуцент тиротрицина — аэробная, спорообразующая грамположительная бактерия.

Температурный оптимум развития около 37 °С. Для получения антибиотика бактерии выращивались в течение 4-5 сут при 37 °С на жидкой питательной среде (обычно мясопептонный бульон), разлитой тонким слоем в матрацы. В процессе развития бактерий образующийся антибиотик в небольшом количестве выделяется в окружающую среду, а основная масса тиротрицина находится в бактериальных клетках.

Тиротрицин — полипептид с большим числом аминокислотных остатков. Биосинтез полипептида осуществляется по мультиферментному тиошаблонному пути.

При выделении антибиотика необходимо помнить, что большая часть его содержится в клетках бактерий, а следовательно, обрабатывать следует как культуральную жидкость, так и бактериальную массу.

Тиротрицин обладает бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении грамположительных бактерий и главным образом гноеродных кокков. Преимущество тиротрицина состоит в том, что он действует на те патогенные микробы (например, фекальный стрептококк), на которые не влияют ни пенициллин, ни сульфаниламидные препараты. Грамотрицательные бактерии устойчивы к действию антибиотика.

В 1941 г. было выявлено, что тиротрицин состоит из двух разных полипептидов. Их разделили и дали самостоятельные названия — тироцидин и грамицидин.

Грамицидины. В процессе разделения грамицидиновой фракции установлено, что грамицидин А находится в преобладающем количестве.

Грамицидин С обладает довольно высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий.

Бацитрацины — полипептидные антибиотики, выделенные Б.Джонсоном с соавторами в 1945г. из культуры *Bacillus licheniformis*. Немного позже (1949) из культуры *B. subtilis*, близкой *B. licheniformis*, была выделена смесь антибиотиков, которая получила название «эйфайвин». Позднее было выяснено, что полипептиды, входящие в эйфайвин, идентичны полипептидам бацитрацина, поэтому было принято решение упразднить название «эйфайвин» и сохранить лишь название «бацитрацин».

Бацитрацины обладают высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий и почти не действуют на грамотрицательные формы.

2. Изучить гетеромерные пептиды.

В эту подгруппу входят полимиксины.

Полимиксины — это родственные антибиотические вещества полипептидной природы, образуемые различными штаммами *Bacillus polymyxa* и *B. circulans*. Об антибиотическом веществе, образуемом *Bacillus polymyxa*, впервые было сообщено в 1947 г. Р. Бенедиктом и А. Лангликком.

П. Стенсли с сотрудниками описали некоторые свойства антибиотика, активного по отношению к грамотрицательным организмам. Эти же авторы предложили назвать выделенный антибиотик полимиксином и определили продуцирующий его организм.

Особенность группы полимиксинов заключается в том, что в составе их молекул имеется 4-5 свободных γ -амиинных групп α , γ -диаминомасляной кислоты, что придает полимиксинам свойство катионных детергентов, способных

образовывать комплексы с фосфолипидами клеточных мембран. Этим и определяется их антибактериальная активность.

Полимиксины отличаются характером побочных реакций. Так, полимиксины А и О обладают высокой нефротоксичностью, в то время как полимиксины В и Е (колистины) — препараты наименее токсичные.

Полимиксины избирательно действуют на грамотрицательные бактерии.

3. Изучить высокомолекулярные пептиды.

В эту подгруппу входят лантибиотики и бактериоцины.

Лантибиотики характеризуются тем, что в их молекулах имеются сульфидные кольца, которые содержат мезолантионин и 3-метиллантионин, а также необычные аминокислоты: дигидромасляную и Э-цистеин. К этой группе антибиотиков относятся более 20 лантибиотиков.

По механизму биосинтеза лантибиотики делятся на две группы: антибиотики, которые синтезируются на рибосомах (низины, субтилин), и полипептиды, биосинтез которых осуществляется не рибосомальным механизмом.

Низины. Из группы лактобактерий в 1944 г. был выделен штамм *Lactococcus lactis*, образующий антибиотик низин.

Низин подавляет развитие ряда грамположительных и некоторых кислотоустойчивых бактерий, не оказывает влияния на грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

Этот антибиотик впервые был получен в Англии под торговой маркой «Низаплин».

Низин нашел применение в пищевой промышленности в качестве консерванта некоторых скоропортящихся продуктов (томаты, зеленый горошек и др.), а также для предупреждения порчи сыров. Консервированный сыр, не содержащий низина, полностью портится в течение 25-50 дней. При добавлении к сырьем 50 ед./г низина за 200 дней хранения было испорчено всего лишь 27% банок с сыром, взятых в опыт.

Безопасность использования низина при хранении пищевых продуктов обусловлена тем, что, имея полипептидную структуру, этот антибиотик в организме человека быстро разрушается до аминокислот ферментами пищеварительного тракта. Благодаря этому исключается возможность накопления низина в организме человека и появления резистентных к нему форм микроорганизмов.

Низин не используется в медицинской практике, но с успехом применяется в ветеринарии для лечения маститов у коров.

Бактериоцины. Различные штаммы *E. coli* способны образовывать антибактериальные вещества белковой природы с молекулярной массой от 50 000 до 90 000, получившие название колицинов.

Джакоб с соавторами в начале 50-х гг. XX в. предложили называть антимикробные белки колицинового типа бактериоцинами.

Бактериоцины, продуцируемые лактобактериями, подразделяют на две группы. Представители первой группы характеризуются узким спектром антибактериального действия, они подавляют развитие бактерий, близких к организму-продуценту. В эту группу входят следующие бактериоцины: лактоцин, амиловорин и др. Ко второй группе относятся антибиотики, ингибирующие рост многих видов грамположительных микроорганизмов. Сюда относятся такие бактериоцины, как ацидоцин В, курвацин, лактицин и ряд других.

Бактериоцины, вырабатываемые лактобациллами и лактобактериями, находят применение в пищевой промышленности: при производстве сухих колбас, ферментации зеленых олив, приготовлении йогуртов, сыров и других продуктов. В

качестве средств борьбы с фитопатогенными организмами перспективно использовать непосредственно сами бактерии — продуценты бактериоцинов.

2.8 Лабораторная работа № 11-12-13 (6 часов).

Тема: «Антибиотики, образуемые актиномицетами»

2.8.1 Цель работы: изучить препараты - антибиотики, образуемые актиномицетами

2.8.2 Задачи работы:

1. Изучить препарат «Стрептомицина сульфат»
2. Изучить препарат «Дигидрострептомицин сульфат»
3. Изучить препарат «Неомицина сульфат»
4. Изучить антибиотики группы тетрациклина
5. Изучить макролиды третьего поколения
6. Изучить противогрибковые препараты

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, образуемые актиномицетами»

2.8.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить препарат «Стрептомицина сульфат».

Препарат «Стрептомицина сульфат» (ветеринарный) представляет собой соль органического основания, которая продуцируется лучистым микроскопическим грибом. В продажу этого средства поступает в виде гигроскопичного порошка или пористой массы белого цвета, горьковатого вкуса, без какого-либо запаха и легко растворимого в воде, новокаине и физиологическом растворе.

Антимикробная эффективность этого медикамента обусловлена его способностью угнетать синтез белка в микробных клетках на уровне рибосом. Следует также отметить, что данный препарат не оказывает никакого воздействия на инфекции, вызываемые Clostridia и прочими анаэробными микроорганизмами, грибами, плазмодиями, вирусами и риккетсиями. Кроме того, у некоторых микроорганизмов проявляется высокая устойчивость к стрептомицину, а у размножающихся бактерий резистентность к антибиотику возникает в течение нескольких суток. При этом большинство резистентных штаммов развивается к концу второго месяца терапии. Чтобы предотвратить такое явление и устраниить инфекцию, следует использовать большие дозировки препарата, а также комбинировать его вместе с другими противомикробными средствами.

«Стрептомицина сульфат» назначают: при leptospirose, туляремии, пневмонии; отечной болезни свиней и роже, катаральной горячке (злокачественной); диплококковых инфекциях, маститах, эндометритах; эндокардитах, менингите, послеродовом и раневом сепсисе; актиномикозе рогатого скота и кампилобактериозе, а также других заболеваниях, возбудители которых высокочувствительны к стрептомицину.

Перед использованием рассматриваемого средства его растворяют в физиологическом растворе, стерильной воде или же 0,25-0,5 %-м растворе новокаина. При этом придерживаются следующего соотношения: 0,25 г стрептомицина и 1 мл растворителя. Кстати, раствор глюкозы в качестве последнего использовать запрещается. Более концентрированные средства могут

оказаться слишком болезненными. Готовый раствор можно хранить при комнатной температуре в течение недели (лучше содержать в холодильной камере).

2. Изучить препарат «Дигидрострептомицин сульфат».

Дигидрострептомицина сульфат — бактерицидный препарат, антибиотик широкого спектра действия, продукт восстановления стрептомицина.

Дигидрострептомицина сульфат относительно малотоксичен, не обладает кумулятивными свойствами.

Дигидрострептомицина сульфат применяется по тем же показаниям, что и Стрептомицин: при различных формах туберкулёза, туберкулёз лёгких, лимфатических узлов, рта, гортани, трахеи, бронхов, кишечника, мочевых и половых органов, серозных оболочек, костей, суставов, глаз и кожи.

Препарат применяется также при менингитах, заболеваниях, вызванных чувствительными к стрептомицину микробами (кишечная палочка, тифозные и паратифозные палочки, синегнойная палочка и др.), заболеваниях мочевых путей, эндокардите, вызванном пенициллиноустойчивыми микробами, при туляремии, при острой форме бруцеллёза.

3. Изучить препарат «Неомицина сульфат».

Антибиотик, образующийся в процессе жизнедеятельности лучистого гриба *Streptomyces fradiae*. Неомицина сульфат — антибиотик широкого спектра действия. Активен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в т. ч. резистентных к другим антибиотикам (пенициллин, стрептомицин, левомицетин, тетрациклин). На патогенные грибы, вирусы и анаэробную флору не действует. Резистентность микроорганизмов к неомицину развивается медленно в небольшой степени. Не инактивируется воспалительными экссудатами, ферментами, желудочным соком. При пероральном введении неомицина сульфат почти не всасывается и оказывает местное действие на микрофлору кишечника. Выводится из организма главным образом с калом и мочой. Применение: колибактериоз, пастереллез, гастроэнтероколиты и другие заболевания желудочно-кишечного тракта бактериальной этиологии. Инфекции кожного покрова, вызванные преимущественно стафилококком и эшерихией.

Особые указания. Убой на мясо животных, которым задавали неомицина сульфат, разрешается через 7 суток после прекращения применения препарата. Мясо животных, вынужденно убитых до истечения указанного срока, используют для кормления плотоядных животных или производства мясо-костной муки.

4. Изучить антибиотики группы тетрациклина.

Доксициклин (*Doxycyclinum*).

Фармакологическое действие. Антибиотик широкого спектра антимикробного действия. Активен в отношении большинства грамположительных (стафилококки, пневмококки, стрептококки) и грамотрицательных микроорганизмов (менинго- и гонококки, эшерихии, сальмонеллы, шигеллы, энтеробактерии), а также риккетсий, микоплазм, возбудителей орнитоза (острой инфекционной болезни, передаваемой человеку от птиц), пситтакоза (острой инфекционной болезни, передаваемой человеку от птиц), трахомы (инфекционного заболевания глаз, которое может привести к слепоте) и некоторых простейших.

Показания к применению. Применяют при заболеваниях, вызванных чувствительными к нему микроорганизмами: бронхите (воспалении бронхов) острым и подострым, пневмонии (воспалении легких), плевrite (воспалении оболочек легкого) и инфекциях мочевыводящих путей, включая гонорею.

Метациклина гидрохлорид (*Methacyclinumhydrochloridum*).

Фармакологическое действие. Антибиотик тетрациклического ряда, обладающий широким спектром антимикробного действия. Активен в отношении большинства грамположительных (стафилококки, пневмококки, стрептококки) и

грамотрицательных микроорганизмов (эшерихии, сальмонеллы, шигеллы и др.), а также возбудителей орнитоза (острой инфекционной болезни, передаваемой человеку от птиц), пситтакоза (острой инфекционной болезни, передаваемой человеку от птиц), трахомы (инфекционного заболевания глаз, которое может привести к слепоте) и некоторых простейших. Препарат не действует на большинство штаммов протея и синегнойной палочки, на грибы, мелкие и средние вирусы.

Показания к применению. Сепсис (заражение крови микробами из очага гнойного воспаления), подострый септический эндокардит (воспаление внутренних полостей сердца вследствие наличия в крови микробов), ангины, отиты (воспаление полости уха), инфекции желче и мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта, гнойные инфекции кожи и мягких тканей, инфицированные ожоги и раны, остеомиелит (воспаление костного мозга и прилегающей костной ткани), гинекологические инфекционные заболевания, плевриты (воспаление оболочек легкого), острые и хронические бронхиты (воспаление бронхов), острые пневмонии (воспаление легких) и обострение хронических пневмоний, осложненных бронхэктомиями (заболеванием бронхов, связанном с расширением их просвета).

Миноцилин (Minocyclinum).

Фармакологическое действие. Полусинтетический антибиотик из группы тетрациклинов. Действует бактериостатически (препятствует размножению бактерий) и обладает широким спектром действия. Активен в отношении *Mycoplasmapneumoniae*, *Haemophilusinfluenzae*, *Klebsiella*, *Streptococcus pneumoniae* и других штаммов *Streptococcus*, *Staphylococcus aurens*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Chlamidia*, *Neisseriameningitidis*.

Показания к применению. Бактериальные инфекции, вызванные чувствительными к препарату микроорганизмами: инфекции верхних и нижних дыхательных путей; орнитоз (острая инфекционная болезнь, передаваемая человеку от птиц), пситтакоз (острая инфекционная болезнь, передаваемая человеку от птиц), уретриты (воспаление мочеиспускательного канала), синдром Рейтера (инфекционно-аллергическая болезнь, характеризующаяся сочетанием уретрита (воспаления мочевыводящих путей), конъюнктивита (воспаления наружной оболочки глаза) и множественного повреждения суставов), конъюнктивиты, трахома (инфекционное заболевание глаз, которое может привести к слепоте), венерический лимфогрануломатоз (паховый лимфогрануломатоз (венерическая болезнь) - болезнь, передающаяся половым путем; характеризуется воспалением паховых лимфатических узлов с последующим образованием кровоточащих язв; чума, туляремия (острое инфекционное заболевание, передающееся человеку от животных), сибирская язва, холера, бруцеллез (инфекционное заболевание, передающееся человеку, как правило, от сельскохозяйственных животных), возвратная лихорадка (тиф возвратный эпидемический - инфекционная болезнь, передающаяся клещами и характеризующаяся многочисленными, нерегулярными подъемами температуры тела); инфекции кожи и мягких тканей, вызванные *Streptococcus*, *Staphylococcus aurens*. Лечение бессимптомных носителей *Neisseriameningitidis*.

Препарат не применяют для лечения менингококковой инфекции и для лечения любых инфекций, вызванных *Staphylococcus aurens*. Для больных, обладающих повышенной чувствительностью к пенициллином, миноцилин применяют в качестве альтернативного лекарственного средства при следующих инфекциях: гонорея, листериозы (инфекционная болезнь животных, передающаяся человеку; характеризуется многочисленными поражениями лимфатических узлов, септицимиией (наличием в крови микробов без образования очагов гнойного

воспаления в тканях)), актиномикозы (грибковые заболевания); инфекции, вызванные Clostridium.

Окситетрациклина гидрохлорид (OxytetracyclinhydrochJoridum).

Фармакологическое действие. Антибиотик группы тетрациклических. Обладает широким спектром действия: активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, спирохет, хламидий, микоплазмы. Действует бактериостатически (препятствует размножению бактерий).

Показания к применению. Бактериальные инфекции: пневмония (воспаление легких), бронхит (воспаление бронхов), эмпиема плевры (скопление гноя между оболочками легких), ангину, холецистит (воспаление желчного пузыря), эндометрит (воспаление внутренней оболочки матки), простатит (воспаление предстательной железы), сифилис, гнойные осложнения хирургических операций и др., вызванные чувствительными к препарату микроорганизмами.

Тетрациклин (Tetracyclinum).

Тетрациклин является антимикробным веществом, продуцируемым *Streptomyces aurefaciens* или другими родственными организмами.

Показания к применению. Применяют тетрациклин внутрь и наружно. Внутрь назначают больным' пневмонией (воспалением легких), бронхитом (воспалением бронхов), гнойным плевритом (воспалением оболочек легкого), подострым септическим (связанным с наличием микробов в крови) эндокардитом (воспалением внутренних полостей сердца), бактериальной и амебной дизентерией, коклюшем, ангиной, скарлатиной, гонореей, бруцеллезом (инфекционным заболеванием, передающимся человеку, как правило, от сельскохозяйственных животных), туляремией (острым инфекционным заболеванием, передающимся человеку от животных), сыпным и возвратным тифами, пситтакозом (острой инфекционной болезнью, передаваемой человеку от птиц), при инфекционных заболеваниях мочевых путей, хронических холециститах (воспалении желчного пузыря), гнойном менингите (гнойном воспалении оболочек мозга) и при других инфекционных заболеваниях, вызванных микроорганизмами, чувствительными к этому антибиотику. Тетрациклин можно также применять для предупреждения инфекционных осложнений у хирургических больных. Местно назначают тетрациклин при инфекционных заболеваниях глаз, ожогах, флегмонах (остром, четко не ограниченном гноином воспалении), маститах (воспалении молоковыносящих протоков молочной железы) и т. п.

Тетрациклина гидрохлорид (Tetracyclinhydrochloridum).

Фармакологическое действие. Тетрациклина гидрохлорид отличается от тетрациклина (основания) лучшей растворимостью в воде. Может применяться внутримышечно, для введения в полости, местно, а также внутрь.

Показания к применению. Показания к применению такие же, как для тетрациклина.

5. Изучить макролиды третьего поколения.

Макролиды последнего поколения представляют собой фармакологическую группу лекарственных препаратов, относящуюся к антибиотикам. Они обладают предельно мягким воздействием, поэтому являются незаменимыми для лечения пациентов, склонных к аллергическим реакциям на Ципосфарин или Пенициллин, а также широко применяются в области педиатрии. По своей сути макролиды – это антибиотики, отличающиеся максимальной безопасностью для здоровья пациента.

Макролиды нового поколения отлично борются с болезнетворными микроорганизмами и болезнетворными инфекциями. Терапевтическое воздействие достигается благодаря способности нарушать белковый синтез, воздействуя на клеточную рибосому микробов. Макролиды обладают, так называемой,

иммуномодулирующей активностью, позволяющей оказывать благотворное влияние на функционирование иммунной системы.

Одним из характерных преимуществ препаратов последнего поколения является способность к подавлению атипичных микробактерий и высокой степенью активности к борьбе с большинством болезнетворных возбудителей, имеющих привыкание к другим видам антибиотиков.

По препаратам: Азитромицин. Фузидин. Линкомицин. Сумамед. Клиндамицин. Затрин. Азитромакс. Зомакс.

6. Изучить противогрибковые препараты.

Нистатин — противогрибковый антибиотик из группы полиенов, высокоактивен в отношении грибов рода *Candida*. Практически не всасывается в ЖКТ. В последнее время практически не используется.

Леворин — наиболее активен в отношении *Candida albicans*, простейших — трихомонад, амеб, лейшмании. При гипертрофии предстательной железы снижает дизурические явления, иногда уменьшает размерыadenомы. Показания к применению: Кандидоз кожи, кишечника, полости рта и глотки. Леворин в таблетках применяют при кандидоносительстве, кандидозе ЖКТ, при гипертрофии предстательной железы в составе комплексной терапии.

Пимафуцин (Натамицин) — противогрибковый полиеновый антибиотик, оказывает фунгицидное действие. К пимафуцину чувствительны большинство плесневых, патогенных дрожжевых грибов, включая роды *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Penicillium*. Таблетки Пимафуцина, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, оказывают действие только в просвете кишечника, не оказывая системного действия.

Амфотерицин В — аналоги Амбизом, Амфоглюкамин, Амфоцил, Амфолип, Фунгизон — это лиофилизат для инфузий. Используется при жизнеугрожающих, прогрессирующих грибковых инфекциях, диссеминированных формах кандидоза, инфекциях брюшной полости, перитонита, грибковых сепсисах.

2.9 Лабораторная работа № 14 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками»

2.9.1 Цель работы: изучить препараты - антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.

2.9.2 Задачи работы:

1. Изучить пенициллины
2. Изучить антибиотики из лишайников

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками»

2.9.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить пенициллины.

Естественные (природные) пенициллины — это антибиотики узкого спектра действия, влияющие на грамположительные бактерии и кокки.

Бензилпенициллин, применяемый в виде хорошо растворимых **натриевой и калиевой солей**, действует кратковременно — 3–4 ч, т.к. быстро выводится из организма, и это требует частых инъекций.

Пролонгированные формы бензилпенициллина, или депо-пенициллины: **Бициллин-1, Бициллин-3, Бициллин-5**. Они медленно всасываются из места введения, создавая депо в мышечной ткани. Это позволяет поддерживать

концентрацию антибиотика в крови значительное время и сократить, таким образом, частоту введения препарата.

Полусинтетические пенициллины - **клоксациллин, флоклоксациллин, метициллин, нафциллин и диклоксациллин**, которые вследствие высокой токсичности и/или малой эффективности не нашли клинического применения.

Ампициллин и амоксициллин имеют близкие спектры действия.

2. Изучить антибиотики из лишайников.

Лишайники производят многие антибиотические вещества, свойства которых существенно отличаются от всех известных до настоящего времени антибиотиков растительного происхождения.

Начиная с 1946 г. исследователи обратили внимание на лишайниковые кислоты, и особенно на усниновую кислоту, обладающую сильными антибиотическими свойствами.

Усниновая кислота производится многими видами лишайников, относящихся к семействам Usneaceae, Parmeliaceae и Cladoniaceae.

В 1948 г. была получена растворимая натриевая соль усниновой кислоты — бинан. Изучение антимикробных свойств бинана показало, что он обладает избирательным действием по отношению к грамположительным бактериям (B. subtilis, B. mesentericus, S. albus и др.) и некоторым анаэробным формам. Особенно чувствительны к бинану дифтерийные палочки. По действию на организмы натриевая соль усниновой кислоты обладает бактериостатическим свойством.

2.10 Лабораторная работа № 15 (2 часа).

Тема: «Цефалоспорины и цефамицины»

2.10.1 Цель работы: изучить действия цефалоспоринов и цефамицинов.

2.10.2 Задачи работы:

1. Изучить цефалоспорины
2. Изучить цефамицины

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Цефалоспорины и цефамицины»

2.10.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить цефалоспорины.

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.

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., из них около 100 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.) обладают высокой биологической активностью в отношении

стафилококков, стрептококков, пневмококков, многих видов энтеробактерий, в том числе *E. coli*, *Proteus mirabilis*.

Цефалоспорины II поколения (цефамандол, цефокситин, цефуроксим и др.) характеризуются высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, устойчивы к действию β -лактамаз. Они не оказывают заметного действия на энтерококки, *Pseudomonas aeruginosa*.

Цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефаклор, цефтазидим, цефтриаксон, цефтизоксим, цефоперазон, цефпирамид и ряд других) отличаются высокой антимикробной активностью в отношении энтеробактерий, в том числе устойчивых к другим антибиотикам. Группа цефалоспоринов, относящихся к III поколению, устойчива к действию β -лактамаз, образуемых грамотрицательными бактериями. Для них характерна повышенная антибиотическая активность в отношении *E. coli*, ряда штаммов *Proteus*, *Enterobacter*. Вместе с тем они обладают умеренной активностью по отношению к стафилококкам. Особый интерес представляет цефтриаксон, цефпирамид. Цефтриаксон способен в течение длительного периода времени сохраняться в организме больного: период его полувыделения из организма человека составляет 8 ч. Эта особенность препарата позволяет применять его всего лишь раз в день.

Цефпирамид (тамицин) обладает широким спектром антибактериального действия. Он подавляет рост аэробных и анаэробных форм грамположительных и грамотрицательных бактерий. Цефпирамид легко проникает через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и взаимодействует с пенициллинсвязывающими белками. Находит применение в медицинской практике при лечении различных бактериальных инфекций, в том числе при лечении заболеваний верхних дыхательных путей, хирургических и гинекологических инфекций.

Цефалоспорины III поколения широко применяются в медицинской практике.

Цефалоспорины IV поколения (цефпиром, цефепим и др.). Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов, устойчив к β -лактамазам. Высокий бактерицидный эффект цефпирома связан с тем, что антибиотик с большой скоростью проникает через клеточную стенку бактерий (быстрее в 5-20 раз, чем цефотаксим и цефтриаксон), обладает высоким средством к пенициллинсвязывающим белкам, низкой степенью гидролиза β -лактамазами. Находит практическое применение при лечении инфекций нижних дыхательных и мочевыводящих путей, а также гинекологических и других заболеваний.

Цефепим обладает необычными биологическими свойствами: низким средством к β -лактамазам и очень быстрым транспортом в периплазматическое пространство. Практически не обнаружена резистентность к нему чувствительных штаммов энтеробактерий.

2. Изучить цефамицины.

Цефамицины (Cephemycines) — антибиотические вещества, близкие по структуре цефалоспоринам, они отличаются от последних тем, что в 7-м положении β -лактамного кольца вместо Н имеют метоксигруппу ($\text{CH}_3\text{O}-$) и в связи с этим относятся к оксоцефемам.

Известно несколько вариантов цефамицинов: А, В и С. Наибольшую ценность представляет цефамицин С, проявляющий высокую антибиотическую активность в отношении грамотрицательных бактерий, он устойчив к действию β -лактамаз.

В результате химической модификации цефамицинов получены ценные препараты, в том числе цефокситин, цефотетан и др.

Натриевая соль цефокситина — мифоксин — обладает широким антибактериальным спектром, подавляя развитие аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Этот препарат устойчив к β-лактамазам и применяется при лечении перитонита, гинекологических инфекций, эндокардита, заболеваний мочевыводящих путей и др.

Некоторые виды *Nocardia* в процессе жизнедеятельности могут синтезировать своеобразные β-лактамные антибиотики, имеющие моноциклические структуры — монобактамы. Примеры таких монобактамов — нокардицин А.

Первым представителем этого класса моноциклических β-лактамов можно назвать антибиотик бактериального происхождения азtreонам, описанный в 1981 г.

Механизм действия этого антибиотика идентичен таковому для других β-лактамных антибиотиков в отношении грамотрицательных бактерий, т.е. под влиянием азtreонама инактивируются пенициллинсвязываемые белки (PBP) клеточной стенки бактерий.

Азtreонам применяется в медицинской практике для лечения заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями: инфекций мочевыводящего тракта, желчного тракта, гонореи, остеомиелитов.

Итак, суммируя сказанное об антибиотиках β-лактамной группы, следует подчеркнуть, что β-лактамное кольцо служит основой ряда ценных антибиотических веществ, продуцируемых различными микроорганизмами, в том числе мицелиальными грибами, стрептомицетами, нокардиями. К этой группе антибиотиков относятся: пенициллины, цефалоспорины, цефамицины, оксоцефемы, сульбактамы, карбапенемы, клавулановая кислота, монобактамы.

2.11 Лабораторная работа № 16 (2 часа).

Тема: «Аллицин. Берберин. Госсипол. Хинин»

2.11.1 Цель работы: изучить фармакологические свойства аллицина, берберина, госсипола и хинина.

2.11.2 Задачи работы:

1. Изучить фармакологические свойства аллицина
2. Изучить фармакологические свойства берберина
3. Изучить фармакологические свойства госсипола
4. Изучить фармакологические свойства хинина

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Аллицин. Берберин. Госсипол. Хинин»

2.11.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить фармакологические свойства аллицина.

Аллицин — продукт жизнедеятельности чеснока (*Allium sativum*) — выделен и подробно изучен К. Коваллито с сотрудниками в 1944 г. Антибиотик выделяют из чеснока экстракцией органическими растворителями и очищают перегонкой с водяным паром.

Аллицин, выделенный из чеснока, — очень неустойчивое соединение: при комнатной температуре он разрушается в течение нескольких суток. Однако неповрежденный чеснок сохраняет антибиотическую активность в течение года и более. Изучение этого явления показало, что в чесноке аллицин содержится не в

виде свободного соединения, а в виде вещества, которое может переходить в антибиотик. Это вещество было названо аллиином.

Аллиин не имеет запаха чеснока и не обладает антибиотическими свойствами. Превращение аллиина в аллицин происходит под влиянием специфического фермента аллииназы, содержащегося в соке чеснока. Из чеснока, охлажденного до -40°C , аллиин можно выделить методом экстракции 80-85%-м этиловым или метиловым спиртом, затем экстракт смешивают с твердой CO_2 . В этих условиях аллиин выпадает в осадок в виде игольчатых кристаллов. Под действием аллииназы аллиин превращается в аллицин с выделением пировиноградной кислоты и аммиака. Аллицин принадлежит к группе серосодержащих алифатических соединений. Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных микробов и развитие туберкулезной палочки. Антибиотик относительно высокотоксичен. Летальная доза его при внутривенном введении мышам составляет 60 мг/кг, при подкожном — 120 мг/кг. Высокая токсичность аллицина и неустойчивость препарата делают невозможным его применение в медицине.

2. Изучить фармакологические свойства берберина.

Берберин представляет собой вытяжку из различных растений. Его употребляют благодаря его способности бороться с диабетом, который может сопротивляться действию некоторых других медицинских препаратов.

Берберин — это алкалоид, входящий в состав многих растений, используемых в традиционной китайской медицине. Берберин употребляют из-за его противовоспалительного и антидиабетического воздействия. Более того, он может благотворно влиять на желудочно-кишечный тракт и понижать уровень холестерина в крови. Берберин может понижать уровень глюкозы, которую вырабатывает печень.

Берберин традиционно использовался в древнеиндийской и традиционной китайской медицине (посредством растений, его содержащих) в качестве противомикробного, антипротозойного и противодиарейного средства.

1) Берберин доказал свою эффективность против разнообразных бактерий, таких как холера, лямблия, шигелла и сальмонелла. Вероятно, в этот список также входят стафилококк, стрептококк и клостридий.

2) Берберин подавляет действие простейших микроорганизмов, таких как кишечная лямблия, влагалищная трихомонада, лейшмания и малярия.

3) Как ни удивительно, но неочищенный экстракт более эффективен против простейших, чем берберин в чистом виде, и это позволяет предположить, что берберин усиливает действие других составляющих растений, в которых он содержится.

Берберин оказывает противодействие бактериям и простейшим микроорганизмам, что лежит в основе традиционного использования растений, которые его содержат. Берберин содержится в растениях, принадлежащих самым разным семействам, в том числе — Маковым, Барбарисовым, Дымянковым, Лунносемянниковым, Лютиковым, Рутовым и Анноновым.

3. Изучить фармакологические свойства госсипола.

Госсипол — природный полифенол, обладающий химиотерапевтической активностью в отношении различных вирусов и бактерий. Специфический пигмент хлопчатника. Обладает высокой токсичностью. При длительном применении угнетает сперматогенез у самцов животных и человека.

В природе выполняет функцию защиты растения от вредителей и болезней и содержится в растении преимущественно в свободной форме.

Продукт, получаемый при переработке семян хлопка или из корней хлопчатника (*Gossypium sp.*), сем. мальвовых (Malvaceae). Мелкокристаллический

порошок от светло-желтого до темно-желтого цвета с зеленоватым оттенком. На свету темнеет. Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте. Препарат обладает химиотерапевтической активностью в отношении различных штаммов вирусов, в том числе дерматотропных штаммов вируса герпеса. Оказывает слабое действие на грамположительные бактерии. Применяют в виде 3 % линимента (Linimentum Gossypoli 3 %) - желтой или желтой со слегка зеленоватым оттенком густой массы со своеобразным запахом. Назначают при лечении опоясывающего герпеса, простого герпеса, псориаза. Наносят на пораженные участки тонким слоем 4 - 6 раз в сутки. Курс лечения обычно 5 - 7 дней. При герпетическом кератите назначают: также 0,1 % раствор госсипола (в 0,07 % водном растворе натрия бората). Закапывают в конъюнктивальный мешок по 1 капле 5 - 6 раз в день в течение 11 - 15 дней. Инстилляции в глаз могут сопровождаться жжением и гиперемией, проходящими при отмене препарата. Формы выпуска: порошок; 3 % линимент в банках оранжевого стекла (по 20 г).

Госсипол в связанном виде входит в состав российского противовирусного препарата Кагоцел. Однако Кагоцел принципиально отличается от природного госсипола, поскольку в ходе его получения методом химического синтеза ответственные за проявления токсических свойств альдегидные остатки молекул госсипола оказываются полностью связанными с полимерным носителем — окисленной карбоксиметилцеллюлозой. Это позволяет резко уменьшить не только общее токсическое действие госсипола, но и устраниТЬ его отрицательное воздействие на мужскую и женскую репродуктивную систему. При производстве субстанции и таблеток Кагоцела полностью исключается и обязательно контролируется отсутствие свободного госсипола в конечных продуктах.

4. Изучить фармакологические свойства хинина.

Хинин — основной алкалоид коры хинного дерева с сильным горьким вкусом, обладающий жаропонижающим и обезболивающим свойствами, а также выраженным действием против малярийных плазмодиев. Это позволило в течение длительного времени использовать хинин как основное средство лечения малярии. Сегодня с этой целью применяют более эффективные синтетические препараты, но по ряду причин хинин находит своё применение и в настоящее время.

Хинин оказывает сложное и многостороннее действие на организм человека и животных. Оказывает антиаритмическое действие, замедляет проводимость, снижает возбудимость и автоматизм сердечной мышцы и одновременно оказывает слабое атропиноподобное действие. Относится к антиаритмическим средствам Ia класса. По антиаритмической активности хинин, однако, уступает своему изомеру хинидину и даёт больше побочных эффектов. Поэтому в качестве антиаритмического средства хинин в настоящее время полностью вытеснен хинидином.

Хинин обладает чрезвычайно горьким вкусом, и, как многие горечи (например, экстракты из полыни или кофеин, стрихнин), при приёме внутрь увеличивает секрецию желудочного сока и стимулирует аппетит. Понижает температуру тела, угнетая терморегулирующий центр гипоталамуса. Ранее[уточнить] его широко применяли как жаропонижающее и как стимулятор аппетита. В наше время, в связи с наличием эффективных жаропонижающих средств и мощных стимуляторов аппетита, хинин практически перестал употребляться в обоих качествах.

Хинин снижает возбудимость ЦНС и оказывает умеренное неспецифическое седативное (успокаивающее) действие, благодаря чему его в средние века и даже в начале XX века достаточно широко применяли в различных комбинациях с бромидами, успокаивающими травами типа валерианы, пустырника, боярышника при «нервном истощении».

Хинин оказывает неспецифическое анальгезирующее действие, особенно выраженное при головной боли, и потенцирует (усиливает) действие наркотических и ненаркотических анальгетиков. Благодаря этому, он достаточно широко применялся ранее в составе некоторых готовых лекарственных комбинаций при головной боли — например, до сих пор выпускаются готовые таблетки «анальгин с хинином».

Хинин тормозит размножение бесполых эритроцитарных форм малярийного плазмодия, что позволяет применять его при малярии. Но и в этом качестве он сегодня применяется редко, так как появились более эффективные и безопасные синтетические противомалярийные средства, в том числе воздействующие на тканевые, «спящие» формы малярийного плазмодия, и на его половые формы, продолжающие своё развитие в организме комаров. Вместе с тем хинин порой бывает эффективен при формах малярии, устойчивых, например, к хлорохину.

2.12 Лабораторная работа № 17 (2 часа).

Тема: «Лизоцим. Эритрин. Экмолин. Интерферон»

2.12.1 Цель работы: изучить фармакологические свойства лизоцима, эритрина, экмолина и интерферона.

2.12.2 Задачи работы:

1. Изучить фармакологические свойства лизоцима
2. Изучить фармакологические свойства эритрина
3. Изучить фармакологические свойства экмолина
4. Изучить фармакологические свойства интерферона

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Лизоцим. Эритрин. Экмолин. Интерферон»

2.12.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить фармакологические свойства лизоцима.

Лизоцим (мурамидаза, англ. lysozyme) — антибактериальный агент, фермент класса гидrolаз, разрушающий клеточные стенки бактерий путём гидролиза пептидогликана клеточной стенки бактерий муреина. Главным образом, лизоцим получают из белка куриных яиц. Также аналогичные ферменты содержатся в организмах животных, в первую очередь, в местах соприкосновения с окружающей средой — в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слёзной жидкости, грудном молоке, слюне, слизи носоглотки и т.д. В больших количествах лизоцимы содержатся в слюне, чем объясняются её антибактериальные свойства. В грудном молоке человека концентрация лизоцима весьма высока (около 400 мг/л). Это намного больше, чем в коровьем. При этом концентрация лизоцима в грудном молоке не снижается со временем, через полгода после рождения ребёнка она начинает возрастать.

Человеческий лизоцим является гликозидазой, которая функционирует в качестве антибактериального средства. Человеческий лизоцим широко распространен в различных тканях и жидкостях организма, в том числе печени, суставных хрящах, крови, слюне, слезной жидкости и молоке.

Фермент атакует пептидогликаны (в частности, муреин), входящие в состав клеточных стенок бактерий (особенно много его в клеточных стенках грам-положительных бактерий — до 50-80 %).

Лизоцим – это лекарственный препарат природного происхождения, обладающий выраженным противомикробным и противопаразитарным действием. Основное действующее вещество препарата – гидрохлорид лизоцима – представляет собой протеолитический фермент, который добывают главным образом из белка куриных яиц. Средство выпускается в форме стерильного лиофилизированного порошка во флаконах по 0,05, 0,15 и 1 г и в медицине используется в основном в качестве местного антисептического препарата.

Механизм антибактериального фармакологического действия Лизоцима основан на разрушении стенки бактериальных микроорганизмов, что приводит к растворению клеток бактерий и их полному уничтожению. В организме человека лизоцим выполняет функцию естественного антибактериального барьера, повышающего иммунную защиту. Он содержится в коже, слюне, слезной жидкости, слизистых оболочках, грудном молоке, а также входит в состав лейкоцитов.

Антибактериальное действие Лизоцима наиболее выражено проявляется в отношении грамположительных бактерий. По отношению к грамотрицательным микроорганизмам фармакологический эффект препарата проявляется в меньшей степени. Помимо своего основного, антисептического эффекта, Лизоцим также обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим и антитоксическим действием. Наиболее выражено эти свойства гидрохлорида лизоцима проявляются при использовании препарата в составе комбинированной терапии.

Гидрохлорид лизоцима способен активно взаимодействовать с различными антибиотиками, увеличивая их эффективность. Благодаря этому, а также ввиду отсутствия токсичности, в большинстве случаев Лизоцим применяется в сочетании с другими лекарственными препаратами, позволяя тем самым добиться комбинированного действия медикаментов.

Основная сфера применения Лизоцима в медицине – это лечение инфекционно-воспалительных и гнойно-септических заболеваний. Как уже упоминалось, Лизоцим для этих целей используют совместно с другими лекарственными препаратами, что позволяет повысить эффективность их фармакологического действия и одновременно положительно оказывается на иммунной системе ослабленного болезнью организма.

2. Изучить фармакологические свойства эритрина.

Эритрин – вещество, получаемое из красных кровяных шариков (эритроцитов) животных. Эритрин проявляет бактериостатическую активность в отношении стафилококков и стрептококков.

Приготовляют из эритроцитов животных. Представляет собой порошок коричнево-черного цвета, растворимый в щелочах, лимоннокислом натрии и спирте, в водной среде растворим при pH = 7,6 — 7,8. Термостабилен. Активен по отношению к дифтерийной палочке, стрептококку и стафилококку.

Применяют при лечении дифтерии как средство, дополняющее сывороточное лечение, и для борьбы с носительством дифтерии. Эритрин применяется в виде раствора в лимоннокислом натрии, мази на глицерине и мази на ланолине.

3. Изучить фармакологические свойства экмолина.

Экмолин - новый антибиотик, препарат, полученный из рыб. Легкий порошок желтоватого цвета, растворимый в воде. Препарат способен задерживать рост дизентерийных и тифозных микробов, стафилококка, стрептококка, холерного вибриона, кишечной палочки и вируса гриппа. Экмолин является мало токсичным препаратом. Ученым медицинским советом Министерства здравоохранения рекомендован для профилактики и лечения гриппа и для удлинения действия пенициллина.

Для профилактики гриппа экомолин назначается в виде 0,5% раствора путем введения в каждую ноздрю 2 - 3 капель, либо путем распыления с помощью пульверизатора (доза 0,5 мл). При соответствующих показаниях введение препарата в той же дозе повторяется через каждые 3 - 4 дня, но не позднее 5-го дня со времени первого введения.

Для лечения гриппа экомолин вводится по 2 - 3 капли в каждую ноздрю три раза в день или применяется в виде ингаляций. При тяжелых формах гриппа препарат одновременно вводится и внутримышечно по 0,5 мл один-два раза в день.

При осложнениях гриппа экомолин следует сочетать с пенициллином как для местного, так и для общего действия.

4. Изучить фармакологические свойства интерферона.

Интерферон человеческий - это низкомолекулярный белок, который обладает ярко выраженным антивирусными и мощными иммуномодулирующими свойствами, а также высокой противоопухолевой активностью.

Интерферон был впервые открыт в 1957 году, когда ученые обнаружили, что это вещество активно препятствует размножению вирусов гриппа, попавших в человеческий организм. Дальнейшие исследования обнаружили, что не только вирусы способны вызывать выработку организмом интерферонов, таким действием обладают различные другие микроорганизмы и некоторые синтетические вещества, названные впоследствии индукторами интерферонов.

Имеется несколько видов интерферонов, вырабатывающихся в организме специальными клетками тканей или созданных синтетическим путем. Интерферон Альфа производят β-лимфоциты периферической крови, а фибробласты производят β-интерферон.

В выработке этого низкомолекулярного белка активное участие принимают Т-лимфоциты, которые не только защищают организм от различных вирусных инфекций, но и от вирусов опухолевой природы. Применение Интерферона эффективно для лечения ряда кожных болезней, которые вызываются патогенными вирусами.

Интерферон человеческий сухой выпускается в форме порошка или ректальных суппозиториев. В одной ампуле 2 мл содержится лиофилизированный порошок, 1000 МЕ противовирусной активности.

Интерферон Альфа (человеческий) представляет собой смесь разных подтипов интерферона натурального из лейкоцитов человеческой крови. Противовирусное действие Интерферона Альфа главным образом основывается на повышении резистентности не инфицированных вирусом клеток к возможному воздействию. На поверхности клетки Интерферон Альфа связывается со специфическими рецепторами и изменяет свойства клеточных мембран, стимулирует ферменты, активно воздействует на РНК вируса, эффективно предотвращая его репликацию.

Иммуномодулирующее свойство вещества основано на стимулировании активности макрофагов и NK клеток, участвующих в иммунном ответе организма на специфические опухолевые клетки.

Применение Интерферона подавляет хламидии и вирусы, нормализует иммунный статус организма, подавляет рост опухолевых клеток.

2.13 Лабораторная работа № 18 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий»

2.13.1 Цель работы: изучить антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий.

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить состав клеточной стенки бактерий
2. Изучить антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий.

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий»

2.13.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить состав клеточной стенки бактерий.

В ходе развития бактерий происходит непрерывный процесс синтеза клеточной стенки, представляющей собой полифункциональную и физиологически активную структуру, через которую происходит взаимодействие между микроорганизмом и средой.

Состав стенки у разных видов неодинаков. Особенно существенные отличия наблюдаются у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Грамположительные бактерии имеют более просто устроенную клеточную стенку, которая составляет от 20 до 35% массы клетки. Основную массу (от 40 до 90%) клеточной стенки составляет пептидогликан (муреин); толщина его слоя достигает 80 нм.

Пептидогликан — это гетерополимер, состоящий из ряда типов субъединиц. Ацетилмуравовая кислота и диаминопимелиновая кислота (в некоторых случаях она заменена лизином) — характерные компоненты пептидогликанов, отсутствующие в других известных биополимерах.

У грамположительных бактерий, в том числе и актиномицетов, пептидогликан — основной компонент клеточной стенки. Он присутствует во всей толще стенки в форме комплекса матрикса с другими полимерами. Пептидогликан образует многослойную структуру с поперечными сшивками. Он обладает опорной функцией полимера в оболочке бактерий, а также регулирует гидролитические процессы в жизнедеятельности бактериальной клетки.

В состав пептидогликана грамположительных бактерий входят четыре сахара, N-ацетилмуравовая кислота (эфир молочной кислоты и ацетилглюкозамина), аминосахара (глюкозамин, галактозамин и производное глюкозамина — муравовая кислота), а-глутаминовая кислота, аланин, лизин или диаминопимелиновая кислота.

У грамположительных бактерий между стенкой и цитоплазматической мембраной встречаются так называемые мембранные тейхоевые кислоты.

Клеточные стенки грамположительных бактерий содержат 2-3% липидов от массы клеточной стенки, при гидролизе выделяют ряд аминокислот, среди которых редко встречаются ароматические и серосодержащие.

Образование пептидогликана — хорошо сбалансированный процесс, где наряду с включением определенных субъединиц происходят реакции, связанные с действием специфических лизических ферментов. Эти реакции способствуют возникновению новых точек роста клеточной стенки.

Грамотрицательные бактерии имеют сложно организованную (многослойную) клеточную стенку, которая значительно тоньше, чем у грамположительных, она составляет от 6 до 9% массы клетки. В клеточной стенке этих бактерий пептидогликан содержится в небольшом количестве, не превышающем 5-10% от массы стенки. Пептидогликан образует тонкую (до 3 нм) непрерывную сетку, как правило, состоящую из мономолекулярного слоя. Между

слоем пептидогликана и цитоплазматической мембраной расположен липопротeinовый слой. Такой же слой липопротеина имеется между внешней мембраной и муреином.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий (в отличие от грамположительных) содержит не только цитоплазматическую, но и так называемую внешнюю мембрану, прикрытую снаружи тонким слоем липополисахарида. Через эту мембрану в периплазматическое пространство проникают питательные вещества и выводятся наружу продукты метаболизма. Внешняя мембрана обеспечивает устойчивость бактерий к антибиотикам и другим вредным для них веществам, находящимся в окружающей среде. Так, у грамотрицательных бактерий кишечной группы внешняя мембрана служит барьером для таких антибиотиков, как макролиды, новобиоцин, рифампицин и др.

Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий представляет собой липидную бислойную структуру: верхний слой состоит в основном из липополисахаридов, нижний — из фосфолипидов. Эти два слоя связываются белками, расположенными в обеих половинах мембраны.

Во внешней мембране находятся белки-порины, способные образовывать поры (каналы), обеспечивающие неспецифическое прохождение через мембрану веществ с относительно небольшой молекулярной массой. Эти каналы, заполненные водой, располагаются строго перпендикулярно поверхности мембраны.

В зависимости от величины электрического потенциала пориновые каналы могут находиться в открытом или закрытом состоянии. Чем дольше каналы находятся в закрытом состоянии, тем в большей степени обеспечивается резистентность бактерий к антибиотикам. Это характерно, например, для синегнойной палочки.

Клеточные стенки грамотрицательных бактерий содержат 18-20% липидов (от массы клеточной стенки) и при гидролизе выделяют большое число аминокислот, среди которых присутствуют серосодержащие.

Бактериальные клеточные стенки — это нерастворимые полимеры. Сшитые пептидные боковые цепи пептидогликана имеют меньше степеней свободы, чем точки роста пептидогликана, содержащие несшитые пептидные цепи; последние и служат центрами комплексообразования с антибиотиками.

Необходимо отметить, что при действии большинства антибиотиков (в том числе и типично бактерицидных) на чувствительные микробные клетки у микроорганизмов наблюдается определенный период, в течение которого при освобождении клеток от действия препарата восстанавливается их жизнеспособность.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки чувствительных бактерий, относятся О-циклосерин, пенициллины, цефалоспорины и др.

2. Изучить антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий.

О-циклосерин является антагонистом О-аланина — аминокислоты, входящей в состав пептидогликана. О-циклосерин подавляет ферменты, катализирующие процесс включения О-аланина в пептидогликан.

Среди пенициллинов высокой антибиотической активностью в отношении некоторых грамположительных бактерий обладает бензилпенициллин. Полусинтетические пенициллины проникают в клетку грамотрицательных бактерий через пориновые каналы внешней мембранны.

Пенициллин О специфически тормозит синтез некоторых аминокислот, входящих в мукокомплекс клеточной стенки бактерий, и подавляет синтез полимеров, входящих в состав бактериальной стенки. Антибиотик блокирует

реакцию транспептидирования, приводящую к образованию новых полиглициновых поперечных связей в клеточной стенке. Это обусловлено прежде всего подавлением активности транспептидазы, катализирующей образование сшивок. В результате нарушается синтез пептидогликана и подавляется рост бактерий.

Таким образом, нарушение синтеза клеточной стенки под действием пенициллина вызывает лизис обнаженной цитоплазмы и гибель клетки, что является основным фактором в механизме действия пенициллина.

Клеточная стенка бактерий имеет специфическую структуру, отличающуюся по составу от стенок клеток других организмов, и поэтому ее синтез обеспечивает возможность избирательного действия антибиотика. Вместе с тем структура клеточных стенок, включающая своеобразные полисахариды, белки, липиды, полипептиды, обеспечивает устойчивость ряда бактерий к действию этих антибиотических веществ.

Цефалоспорины имеют сходный с пенициллинами механизм биологического действия. Они, так же как и модифицированные пенициллины, проникают в бактериальную клетку через пориновые каналы внешней мембранны клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Следовательно, в основе механизма биологического действия пенициллинов и цефалоспоринов лежит процесс подавления активности двух ферментов (транспептидазы муреина и О-аланин-карбоксипептидазы), которые участвуют в образовании основного полимера клеточной стенки бактерий на его заключительном этапе.

Под действием β -лактамов на бактериальные клетки происходит выделение тейхоевых кислот в среду, в результате чего активируются ферменты (фермент), гидролизующие пептидогликан. В итоге это приводит к тому, что клеточная мембрана остается без механической опоры и наступает лизис клетки. В клетках животных и человека указанный полимер отсутствует, и там нет названных выше ферментов. Поэтому пенициллины и цефалоспорины не оказывают действия на животные организмы; основная точка их приложения — биосинтез клеточных стенок бактерий. β -лактамные антибиотики обладают способностью резко снижать устойчивость клеточных мембран к действию лизоцима.

2.14 Лабораторная работа № 19 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов»

2.14.1 Цель работы: изучить свойства антибиотиков, подавляющие синтез клеточной стенки грибов.

2.14.2 Задачи работы:

1. Изучить состав клеточной стенки грибов.
2. Изучить антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов»

2.14.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить состав клеточной стенки грибов.

В состав клеточной стенки дрожжей входят глюканы, маннаны, хитин, белки (в основном маннанпротеины и глюканосвязанные) и липиды. Клеточные стенки мицелиальных грибов содержат сходные с дрожжами полисахариды.

Основными компонентами стенок этих грибов являются хитин, хитозан и некоторые другие полисахариды.

Содержание хитина в клеточных стенках некоторых грибов достигает 20% и более. Этот полисахарид, образуя с глюканами прочный комплекс, во многом обеспечивает ригидность клеточной стенки грибов.

Биосинтез хитина, обычно входящего в состав полисахарида стенок грибов, наиболее активен в кончиках растущих гиф, где образуются микрофибриллы полимера. Выработка хитина катализируется единственным ферментом — хитинсингтазой.

2. Изучить антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки грибов, относится группа полиоксинов, обозначаемых буквами латинского алфавита от A до M. Эти антибиотики имеют своеобразное химическое строение: они относятся к пептидилпиромидиннуклеозидным соединениям. Полиоксины образуются культурой *Streptomyces coelicolor*. Среди этих антибиотиков полиоксин O — наиболее сильный ингибитор синтеза хитина в клеточной стенке грибов. Он подавляет синтез хитина у гриба *Neurospora crassa*.

Полиоксины могут использоваться в качестве фунгицидов, подавляющих рост многих фитопатогенных грибов.

Способностью ингибировать биосинтез хитина обладают также антибиотики никкомицин и туникамицин. Никкомицин подавляет развитие многих грибов, в том числе *Mortierella isabellina*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus circinans*, *Botritis cinerea* и ряд других. Туникамицин в процессе развития стрептомицета накапливается как в мицелии продуцента, так и в культуральной жидкости. Из мицелия антибиотик экстрагируется метанолом, а из культуральной жидкости может извлекаться н-бутанолом. Туникамицин подавляет рост грамположительных бактерий, грибов, вируса табачной мозаики, герпеса.

Антибиотические вещества, способные подавлять биосинтез хитина, могут найти практическое применение в сельском хозяйстве при борьбе с фитопатогенными грибами.

2.15 Лабораторная работа № 20 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, нарушающие функции мембран»

2.15.1 Цель работы: изучить свойства антибиотиков, нарушающие функции мембран.

2.15.2 Задачи работы:

1. Изучить состав мембран бактериальных клеток.
2. Изучить вещества, вызывающие дезорганизацию структуры мембран.
3. Рассмотреть антибиотики, ингибирующие связанный с мембраной белок.
4. Изучить антибиотические вещества – ионофоры.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, нарушающие функции мембран»

2.15.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить состав мембран бактериальных клеток.

По составу мембранные бактериальных клеток — липопротеидные структуры, в которые включены молекулы белка.

Липиды, образующие бимолекулярный слой, составляют структурную основу мембран. В мембранах микроорганизмов (бактерий, грибов) наиболее широко представлены гликолипиды. В бимолекулярный слой включены белки, набор которых определяет свойства и специфику функционирования мембраны. Толщина мембраны составляет 6–8 нм.

Мембранные выполняют ряд функций, основными из которых являются следующие:

а) реакция на изменения, происходящие во внешней среде, и передача информации внутрь клетки;

б) регуляция внутриклеточного содержимого, связанная с активным выбросом продуктов метаболизма или инородных веществ, проникших через мембрану, а также накоплением в клетке субстратов метаболизма.

Перенос (транспорт) веществ через цитоплазматическую мембрану может осуществляться тремя основными путями.

1. Пассивная диффузия. Переносимые вещества должны быть растворимы в гидрофобной среде мембраны.

2. Облегченная диффузия. Вещества, взаимодействуя со специфическим переносчиком, образуют комплекс переносчик — вещество, который и может проходить через мембрану.

3. Энергозависимый транспорт. Для переноса вещества необходим источник энергии. При этом вещество может транспортироваться против градиента концентрации. Иногда концентрация веществ в клетке на два-три порядка выше концентрации веществ во внешней среде, но и в этом случае происходит транспорт их из среды в клетку.

Поступление антибиотиков в клетку микроорганизмов — процесс активного транспорта. Следует подчеркнуть, что на транспортные нужды бактериальная клетка расходует в среднем 20–30% энергии, образуемой в процессе обмена веществ.

Накопление внутри клеток микроорганизмов антибиотика — этого неметаболизирующего ингибитора — объясняется тем, что антибиотики «пользуются» транспортными системами, предназначенными для переноса обычных метаболитов, «подменяя» последние. Такая «подмена» возможна благодаря определенному химическому сходству антибиотиков и нормальных продуктов обмена.

В.К. Плакунов, в частности, показал, что тетрациклические антибиотики переносятся в клетки микроорганизмов с помощью транспортной системы, предназначенной для кислых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой.

Устойчивые к тетрациклином штаммы *Escherichia coli* K-12, *Staphylococcus aureus* 209 и *Mycobacterium citreum* поглощают значительно меньшее количество ¹⁴C-хлортетрациклина, чем исходные чувствительные штаммы.

Устойчивые к тетрациклином микроорганизмы сохраняют типичную для чувствительных штаммов систему транспорта антибиотика с неизменной стереоспецифичностью. Однако они способны (в отличие от чувствительных штаммов) длительно поддерживать внутриклеточную концентрацию антибиотика на уровне более низком, чем концентрация его в среде. Такое «противодействие» поглощению антибиотика требует затраты энергии и подавляется в присутствии цианида и 2,4-динитрофенола.

Антибиотические вещества, оказывающие действие на цитоплазматическую мембрану, можно разделить на три группы.

2. Изучить вещества, вызывающие дезорганизацию структуры мембран.

В группу входят грамицидин С, полимиксины, полиены.

Грамицидин С — антибиотик, нарушающий организацию липопротеидных систем и проницаемость клеток, создаваемую мембраной. Степень этих нарушений зависит от концентрации антибиотика. Грамицидин медленно снижает поверхностное натяжение. Он может вступать в связь с клеточными мембранами. В основе механизма биологического действия грамицидина С лежит нарушение им состояния и функционирования мембран клеток в результате связывания антибиотика с мембранными компонентами. Это вызывает, с одной стороны, изменение проницаемости мембран и быструю потерю клетками жизненно важных соединений типа нуклеотидов, неорганического фосфора, аминокислот, а с другой — угнетение процесса энергетического обмена, особенно его начальной стадии — дегидрирования. Грамицидин С ингибитирует активность ряда ферментов, локализованных в мембране (дегидрогеназы, оксидазы).

Полимиксины — соединения, которые связываются с мембраной бактериальной клетки и нарушают ее нормальную функцию. Под влиянием антибиотиков этой группы при относительно невысоких концентрациях (25 мкг на 1 мг массы сухих клеток) происходит выход из клеток низкомолекулярных веществ (фосфора, пентоз) и распад нуклеиновых кислот. Как уже отмечалось, эти антибиотики обладают высокой биологической активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Однако причина включения в клетки именно грамотрицательных бактерий до сих пор не ясна. Такая селективность может объясняться лишь специфической структурой клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которая благодаря рецептору связывает антибиотик с наружной, а затем и с цитоплазматической мембранами.

Показано, что протопласты многих грамположительных бактерий чувствительны к действию полимиксинов. Это также указывает на то, что полимиксиннепроницаемые клеточные стенки защищают от названных антибиотиков интактные бактериальные клетки.

Пока нет достоверных данных о точной мишени действия полимиксинов в клетках чувствительных к ним микроорганизмов. Установлено, что рецепторами этих антибиотиков могут быть фосфолипиды, в результате взаимодействия с которыми полимиксины вызывают дезорганизацию структуры мембран.

Полимиксины используют в качестве своеобразной системы для изучения взаимодействия антибиотик—мембрана *in vivo*.

Полиеновые антибиотики (нистатин, римоцидин, филипин, эндомицин, кандинцидин, трихомицин и др.) — биологически активные соединения, способные изменять проницаемость клеток, чувствительных к их действию. Как известно, проницаемость клетки зависит прежде всего от цитоплазматической мембраны. Полиены, специфически присоединяясь к цитоплазматической мембране клетки гриба, лишают мембрану способности функционировать в качестве барьера, обеспечивающего избирательную проницаемость.

Специфическая токсичность полиеновых антибиотиков обусловлена их взаимодействием с одним из компонентов цитоплазматической мембраны чувствительных клеток, принадлежащих к стеринам. В результате меняется селективность проницаемости мембран, приводящая к выходу из клетки важнейших метаболитов и нарушению способности мембран контролировать усвоение питательных веществ.

Все полиеновые антибиотики подавляют развитие эукариотных организмов (грибов, протозоа, водорослей), содержащих в своих мембранах стерины. Полиены вызывают лизис протопластов и эритроцитов.

Актиномицины, не относящиеся к полиенам, в животном организме превращаются в свободный радикал. В виде свободного радикала молекула

антибиотика вызывает изменения белков мембран. В результате этого нарушаются транспортные функции мембран, что в конечном счете приводит к гибели клеток.

3. Рассмотреть антибиотики, ингибирующие связанный с мембраной белок.

В эту группу веществ можно включить олигомицин В, образуемый *Streptomyces* sp., близкий *S.diastatochromogenes*. Это соединение относится к антибиотикам, имеющим макроциклическое лактонное строение.

Антибиотик подавляет митохондриальную аденоинтрифосфатазу (АТФ-азу), которая связана с клеточными мембранами и участвует в синтезе или использовании АТФ.

4. Изучить антибиотические вещества – ионофоры.

Некоторые антибиотики (валиномицин, эннатины, нонактин, нигерицин, моненсин, салиномицин, грамицидины) способны индуцировать проницаемость ионов через мембранны клеток; это послужило основой для их названия — антибиотики-ионофоры.

Обычно биологические мембранны непроницаемы для ионов K+. В опытах с митохондриями и клетками *Streptococcus faecilis* было показано, что в присутствии антибиотиков валиномицина или грамицидина С мембранны становятся проницаемыми для этих ионов, но не для ионов Na+ и Li+. Установлено, что подавление роста *S.faecilis* в присутствии валиномицина, грамицидина, нонактина связано с потерей клеткой ионов K+, которая индуцируется этими антибиотиками.

Антибиотики-ионофоры широко используются в качестве соединений, применяемых при изучении процессов транспорта ионов через мембранны.

По принципу действия ионофоры делятся на две группы:

- 1) ионофоры-переносчики (валиномицин, нонактин, эннатины),
- 2) ионофоры, образующие ионпроницаемые поры («каналы»).

К последним относятся линейные грамицидины А, В и С, полиеновые антибиотики (амфотерицин В, нистатин), а также пептидный антибиотик аламетицин.

Валиномицин образуется *S. fulvissimus*. Это — макроциклическийdepsipeptид, в состав которого входят 12 аминокислотных остатков, состоящих из трех идентичных фрагментов.

Этот антибиотик подавляет рост грамположительных бактерий, обладает высокой биологической активностью по отношению к кислотоустойчивым бактериям и некоторым грибам.

Валиномицин способен связывать многие катионы, образуя соответствующие комплексы (валиномицинион). Однако наибольшей специфичностью к комплексообразованию этот антибиотик обладает с ионом калия. Причем высокую индуцирующую способность проводить калий через мембранны валиномицин проявляет в очень низких концентрациях.

После выполнения функции переноса калия антибиотик восстанавливается в прежнюю форму. Антибиотик проявляет универсальность действия на мембранны: индуцирует проводимость ионов калия на природных и искусственных мембранных.

В присутствии типичного ионофора валиномицина мембранны чувствительных бактериальных клеток становятся избирательно проницаемыми для ионов калия. Валиномицин связывает именно ионы калия и транспортирует их через мембранны в тысячу раз активнее, чем ионы натрия.

Аналогичное действие проявляют макротетралиды и эннатины.

Макротетролиды благодаря специфической структуре способны образовывать комплексы с такими однозарядными катионами, как аммоний, калий, натрий и др., при избирательности к ионам аммония и изменять проницаемость мембранны для этих ионов.

Энниатины по своей структуре близки к валиномицину. Они образуются плесневыми грибами из рода *Fusarium*: энниатин А — культурой *F. orthocetus* subsp. *enniatinum*, другие штаммы *F. sp.* синтезируют энниатины В и С.

Комплекс энниатин—K⁺ менее устойчив, чем комплекс валиномицин—K⁺.

К антибиотикам-ионофорам, имеющим полиэфирное строение, относятся нигерицин, моненсин и салиномицин.

Нигерицин образуется культурой стрептомицета, близкой к *S. violaceoniger*.

Этот антибиотик способен переносить через биологические мембранны ионы одновалентных металлов, и главным образом ионы K⁺.

Моненсин вырабатывается *S. cinnamoneus* и *S. hygrophilus*. Он переносит через мембранны преимущественно ионы Na⁺.

Моненсин и салиномицин находят применение в животноводстве в качестве стимуляторов роста животных и как лечебные препараты.

Аламетицин — полипептидный антибиотик грибного происхождения, который описали в 1967 г. Мейер и Рейссер. Его биосинтез идет не по рибосомальному пути. Содержит 20 аминокислотных остатков.

Антибиотик подавляет развитие только грамположительных бактерий. Обладает ионофорным действием, образуя в мембранных бактерий водные каналы меняющегося диаметра. Отмечается, что в образовании одного канала участвуют порядка шести молекул аламетицина. Антибиотик индуцирует проницаемость через мембранны как катионов, так и анионов.

К антибиотикам, образующим ионпроницаемые мембранные каналы, относятся также полиеновые антибиотики (амфотерицин В).

Амфотерицин В, взаимодействуя с эргостеринами мембранны грибов, образует каналы, в результате чего нарушается бимолекулярный слой мембранны и меняются ее функции.

Все вышеуказанные антибиотики выступают в роли специфических «проводников» катионов через мембранны.

2.16 Лабораторная работа № 21 (2 часа).

Тема: «Антибиотики, подавляющие синтез белка»

2.16.1 Цель работы: изучить свойства антибиотиков, подавляющие синтез белка.

2.16.2 Задачи работы:

1. Рассмотреть процесс синтеза белка бактерий
2. Изучить свойства антибиотиков, подавляющие синтез белка

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики, подавляющие синтез белка»

2.16.4 Описание (ход) работы:

1. Рассмотреть процесс синтеза белка.

Впервые специфическое ингибирование синтеза белка бактерий антибиотиками было установлено в 1951 г.

Синтез белка у организмов происходит в основном в цитоплазме на рибосомах. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные частицы, в состав которых входят высокополимерные РНК и белки. У прокариотных организмов эта структура диссоциирует на две субъединицы. В бактериальной клетке рибосомы рассеяны по всей цитоплазме.

Биохимическая роль рибосом — синтез белка. На рибосомах происходит соединение отдельных аминокислот в полипептиды, завершающееся образованием вторичной и третичной структуры белков.

Синтез белка в клетках происходит в результате постепенного вовлечения аминокислот в этот процесс через три последовательные стадии: активации, переноса и собственно синтеза.

1. Активация аминокислот. В процессе биосинтеза белка могут участвовать лишь активированные аминокислоты — аминоацилайденилаты. Активация аминокислот происходит с помощью аденоциантифосфата (АТФ), ионов Mg^{2+} и при участии фермента аминоацил-тРНК-синтетазы (Е).

2. Стадия переноса. Под действием фермента аминоацил-тРНК-синтезаты аминоацилайденилат соединяется с транспортной РНК (тРНК), образуя аминоацил-тРНК.

Аминоацил-тРНК имеет код, используемый в дальнейшем для занятия своего места в полипептидной структуре. Рибосомы связаны с информационной, или матричной, РНК (мРНК), определяющей порядок чередования аминокислот в полипептидных цепочках.

3. Стадия собственно синтеза белка. Комплекс аминоацил-тРНК переносится на рибосомы, где и происходит синтез белка. Сборка полипептидных цепей (образование амидных связей) катализируется 50 3 субъединицей рибосомы, выступающей как рибозим. Этот процесс происходит довольно быстро: связывается до 17 аминокислотных остатков за секунду. Конечная стадия биосинтеза молекулы белка завершается на рибосоме. Синтезированный белок затем распределяется по всей клетке.

Сформировавшиеся белки освобождаются от рибосом, которые после этого могут присоединять новые комплексы аминоацил-тРНК и синтезировать новые белковые молекулы.

Таким образом, целостность и функциональная активность рибосом в клетках — одно из необходимых условий синтеза белковых молекул.

2. Изучить свойства антибиотиков, подавляющие синтез белка.

К числу антибиотиков, ингибирующих образование комплекса аминоацил-тРНК, можно отнести индолмицин, боррелидин и фураномицин. Индолмицин образуется одним из штаммов *Streptomyces griseus* и по своей структуре является аналогом триптофана.

Индолмицин конкурирует с триптофаном в реакции активации.

Боррелидин продуцируется культурой *S. rochei*. Он выступает в качестве конкурента треонина $CH_3CH(OH)-CH(NH_2)COOH$ и ингибирует реакцию переноса.

Фураномицин, образуемый *S. threomyceticus*, конкурирует с изолейцином $CH_3CH_2CH(CH_3)CH(NH_2)COOH$ и ингибирует реакцию переноса этой аминокислоты.

Более подробно рассмотрим антибиотики, подавляющие синтез белка, в их числе аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфеникол.

Аминогликозиды. Аминогликозидные антибиотики в процессе воздействия на синтез белка связываются с 30 S-субъединицами рибосом. Некоторые из них подавляют реакцию инициации (стрептомицин, неомицин), другие — транспептидации (неомицин, канамицины) или транслокации (неомицин, канамицины, гентамицин и др.).

Стрептомицин и другие аминогликозиды благодаря поликатионной природе их молекул быстро проходят через водные пориновые каналы внешней мембранны грамотрицательных бактерий только в аэробных условиях. В процессе взаимодействия этих антибиотиков с клетками бактерий аминогликозиды вытесняют ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} из внешней мембранны и благодаря этому дезорганизуют мембрану, стимулируя свое проникновение. Вместе с тем эти антибиотики очень слабо проникают через цитоплазматическую мембрану анаэробных организмов.

Как уже отмечалось, с повышением рН среды возрастает биологическая активность стрептомицина, связанная в первую очередь с тем, что при этом увеличивается степень поглощения стрептомицина бактериальной клеткой.

Стрептомицин оказывает глубокое и разнообразное влияние на обмен веществ чувствительных к нему микроорганизмов. Антимикробное действие препарата в основном состоит в том, что он тормозит синтез белка в клетке бактерий.

Перед полным подавлением синтеза белка антибиотик успевает нарушить последовательность аминокислот в белках и в результате этого вызвать образование дефектных белков, которые, накапливаясь в мембране, приводят к нарушению ее барьерных функций.

Стрептомицин и другие аминогликозиды ингибируют синтез белка на конечных этапах этого процесса — они тормозят образование белковой молекулы на стадии переноса аминоацил-тРНК к рибосомам, не затрагивая начальную стадию, т.е. стадию активации аминокислот. Основной мишенью действия аминогликозидов является бактериальная рибосома и связанный с нею синтез белка.

Антибиотик ингибирует белковый синтез благодаря избирательному взаимодействию с 30 S-субчастицами рибосомы, вызывая изменение ее А-участка и нарушая, таким образом, процесс поступления аминоацил-тРНК в рибосому и его правильную ориентацию. При таком вмешательстве аминогликозидов происходит ошибочное считывание генетического кода (матрицы), что приводит к неправильному образованию полипептидов, содержащих большое число ошибок. В итоге проявляется бактерицидный эффект антибиотиков.

Тетрациклины. Химическое родство тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина и других антибиотиков тетрациклической группы дает основание считать, что механизм их биологического действия очень близок. Подтверждается это и тем, что формы микробов, устойчивые к одному из тетрациклических, резистентны и к другим антибиотикам этой группы. Однако есть данные, указывающие на некоторые количественные различия в физиологическом действии антибиотиков этой группы.

При низких концентрациях тетрациклические антибиотики проявляют бактериостатический эффект, а при повышении концентрации примерно в 10 раз наблюдается бактерицидное действие. Такие вещества, как глицин и цистеин, в определенной степени снимают действие тетрациклических. Некоторые неотрицательные бактерии способны образовывать вещества, инактивирующие бактериостатическое действие хлортетрациклина.

Отсутствуют данные о наличии бактерий, зависимых от тетрациклических.

Бактериостатические концентрации тетрациклических нарушают клеточный обмен чувствительных микроорганизмов, приводят к разобщению биосинтеза белка и нуклеиновых кислот: синтез белка в клетках приостанавливается, а биосинтез нуклеиновых кислот продолжается, иногда даже стимулируется.

Тетрациклин, накапливаясь в устойчивых к его действию клетках, не подвергается деградации, а сохраняется в активной форме. Вместе с тем в этих условиях антибиотик не способен подавлять синтез белка. По-видимому, в механизме такого действия вовлечен внутриклеточный «ингибитор». У ряда устойчивых к тетрациклину микроорганизмов выделены мутанты по детерминантам устойчивости к этому антибиотику.

Наиболее существенный момент их биологической активности — подавление синтеза белка на рибосомах. Антибиотик специфически подавляет связывание аминоацил-тРНК с А-участком бактериальной рибосомы, расположенным в малой субединице. Главное действие тетрациклических — это

подавление синтеза белка на одной из поздних стадий указанного процесса — на стадии связывания аминоацил-тРНК с 30 S-субчастицами рибосом.

Благодаря наличию в цитоплазматической мембране бактерий системы интенсивного энергозависимого транспорта тетрациклины активно проникают в клетку. Через пориновые каналы эти антибиотики проникают с небольшой скоростью. Через мембранные эукариотических клеток тетрациклины проникать не могут — в этом заключается избирательность их antimикробного действия. Как уже отмечалось, у резистентных форм бактерий существует система энергозависимого активного выброса тетрациклических из клетки.

Изучение влияния на макроорганизм хлортетрациклина показало, что он воздействует на кровяное давление: при быстром введении понижает давление крови, а затем повышает его, по-видимому, непосредственно влияя на выделение адреналина. Антибиотик производит определенный эффект на условные рефлексы, увеличивает рост животных независимо от качества пищи.

Тетрациклины оказывают действие на каталазу крови. В больших дозах они вызывают у животных стойкое нарушение регенерации клеток крови.

Окситетрациклин снижает активность каталазы, а тетрациклин не изменяет активность каталазы крови.

Хлорамфеникол. Основа антибиотического действия хлорамфеникола — подавление синтеза белка.

При низких концентрациях антибиотик в значительной степени тормозит синтез белка у чувствительных к нему бактерий, высокие концентрации подавляют процессы дыхания, образования и накопления глутаминовой кислоты и фенилаланина, блокируют синтез нуклеиновых кислот. Антибиотик препятствует усвоению аминокислот и амиака бактериями.

Хлорамфеникол, с одной стороны, подавляет синтез белка у бактерий на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК к рибосоме, т.е. на конечном этапе биосинтеза белковой молекулы, а с другой — тормозит освобождение рибосомы от пептида, что также приводит к прекращению синтеза белка. Антибиотик блокирует связывание аминоацилолигонуклеотидного фрагмента аминоацил-тРНК с 50 S-субъединицами рибосомы. Он тормозит процесс образования из аминокислот полипептидной цепочки и в конечном счете биосинтез белков.

В результате ингибирования биосинтеза белков у чувствительных к хлорамфениколу клеток накапливаются свободные аминокислоты и выделяются в окружающую среду. Под действием антибиотика нарушение включения аминокислот в белки сопровождается изменением физико-химических свойств рибосом. Антибиотик влияет на формирование и самих рибосомных частиц, приводя к появлению недостроенных рибосом с резко ослабленной способностью к синтезу белка.

Таким образом, искаженный синтез белка под действием хлорамфеникола на конечной его стадии осуществляется несколькими путями: во-первых, хлорамфеникол может нарушать функцию рибосом клетки; во-вторых, взаимодействуя с тРНК, он может прерывать ее связь с рибосомой; в-третьих, возможно образование комплекса антибиотик — рибосома, что также неблагоприятно влияет на функцию рибосом.

Под действием хлорамфеникола немедленно прекращается синтез белка микроорганизмов, а синтез нуклеиновых кислот и пептидогликана при этом продолжается, хотя идет с меньшей скоростью. Все это указывает на то, что первичная мишень действия хлорамфеникола — синтез белка. Антибиотик ингибирует трансферазы бактериальных рибосом. Он легко взаимодействует с 50 S-субъединицей. Это позволяет использовать хлорамфеникол в качестве

ингибитора белкового синтеза при различных лабораторных исследованиях, связанных с данным процессом (изучение системы фаг—хозяин, синтез адаптивных ферментов и др.).

Под влиянием антибиотика нарушается нормальный синтез РНК, в то время как синтез ДНК непосредственно не тормозится им.

Хлорамфеникол избирательно подавляет рост многих видов бактерий, но в тех же концентрациях не оказывает заметного действия на развитие грибов, простейших и клеток животных. Устойчивость этих организмов может быть объяснена, с одной стороны, способностью их мембран не пропускать антибиотик, с другой — отличием путей биосинтеза белка у бактерий.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез белка, относятся также циклогексамиид (подавляет пептидилтрансферазную активность 50 S-рибосомальных субъединиц), эритромицин (связывает 50 S-субъединицы и ингибирует транслокацию), пуромицин (этот антибиотик — аналог тРНК, подавляет образование пептидных связей в процессе биосинтеза белка) и некоторые другие антибиотики.

2.17 Лабораторная работа № 22 (2 часа).

Тема: «Антибиотики – ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов. Антибиотики, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот»

2.17.1 Цель работы: изучить свойства антибиотиков, ингибирующие синтез пуринов и пиримидинов, нуклеиновых кислот.

2.17.2 Задачи работы:

1. Изучить свойства антибиотиков – ингибиторов синтеза пуринов и пиримидинов.
2. Изучить свойства антибиотиков – ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот.

2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики – ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов. Антибиотики, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот»

2.17.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить свойства антибиотиков – ингибиторов синтеза пуринов и пиримидинов.

Подавление синтеза нуклеотидов (пуриновых и пиримидиновых оснований) необходимо рассматривать как определенный этап (стадию) подавления синтеза нуклеиновых кислот. К числу антибиотиков, блокирующих синтез нуклеотидов, относятся такие соединения, как азасерин, саркомицин и некоторые другие.

Азасерин — антибиотик противоопухолевого действия, образуемый *Streptomyces fragilis* он подавляет включение глицина в процессе биосинтеза пуринов. Азасерин — структурный аналог глутамина

В его составе имеется диазогруппировка.

По-видимому, антибиотик вступает в конкуренцию с глутамином за связывание с ферментом, который он необратимо инактивирует. Группа -N=N- молекулы азасерина путем ковалентного присоединения по сульфгидрильной группе вступает в связь с группой фермента, ответственного за перенос =NH от амидной группы глутамина к субстрату при синтезе пуринов.

Азасерин подавляет биосинтез пуринов в результате связывания с ферментом, обеспечивающим превращение формилглицинамидрибонуклеотида в формилглицинамидинрибонуклеотид. Цистеин — основная мишень для действия азасерина.

Азасерин проявляет мутагенные свойства, практического применения в медицине антибиотик не имеет.

Саркомицин (продуцент *Streptomyces egyptrochromogenes*) обладает множественным действием на обмен клеток асцитной опухоли: подавляет включение ^{14}C глицина в белок, синтез пиридиннуклеотидов, включение фосфора в нуклеотиды и нукleinовые кислоты. Обладает слабой антбактериальной активностью.

2. Изучить свойства антибиотиков – ингибиторов синтеза нукleinовых кислот.

Актиномицины способны подавлять синтез белка и ДНК-зависимую РНК-полимеразу в результате образования комплексов с ДНК через дезоксигуаниновые остатки, но не оказывают влияния на образование ДНК, что привлекло внимание многих исследователей. Так, актиномицин D в концентрации 5 мкг/мл полностью останавливает у *B. subtilis* синтез белка и РНК и не влияет на синтез ДНК. При использовании суббактериостатических количеств актиномицина C повышается даже концентрация ДНК у *B. subtilis*.

При более высоких концентрациях актиномицин ингибирует ДНК-полимеразу.

Таким образом, под действием актиномицинов происходит лишь ингибирование синтеза белка и РНК. Возможно, однако, что подавление синтеза белка является функцией подавления синтеза РНК.

Актиномицины тормозят также синтез РНК в клетках животной ткани и в опухолевых клетках в результате образования высокоспецифичного комплекса с ДНК-матрицей. Установлено, что антибиотик препятствует продвижению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК-матрицы. В образовавшемся комплексе актиномицин — ДНК пептидная часть молекулы антибиотика размещается в малой борозде двойной спирали ДНК.

Образование комплекса актиномицин — ДНК обусловливает биологическое действие этого антибиотика, связанное с изменением функции нукleinовых кислот.

Митомицины, образуемые *S. caespitosus*, — антибиотики широкого спектра антибиотического действия, подавляют развитие многих видов бактерий, простейших, а также задерживают рост опухолевых клеток.

Механизм биохимического действия этих биологически активных веществ противоположен действию актиномицинов: митомицины приостанавливают синтез ДНК, практически не влияя на синтез РНК и белка. Бактерицидное действие антибиотика очень быстрое. Однако синтез вирусной ДНК весьма устойчив к действию митомицина. Более того, имеются данные, показывающие, что под действием митомицинов ДНК расщепляется на кислоторастворимые фрагменты. Причина расщепления ДНК под действием митомицинов окончательно еще не выявлена. Вместе с тем имеются указания на то, что митомицин С способен образовывать поперечные сшивки в молекуле ДНК.

Митомицин С обладает мутагенными свойствами, а также способностью индуцировать (активизировать) фаги бактерий.

Дауномицин (синонимы: даунорубин, рубомицин) образуется стрептомицетами *S. reusicetus*, *S. coeguleogrubidus*.

Антибиотики проявляют противоопухолевое действие.

Механизм биологического действия дауномицина определяется способностью «встраиваться» между парами оснований ДНК. Антибиотик связывается с теми участками ДНК, где есть Г-Ц-пары. Хромофор дауномицина как бы раздвигает пары оснований в ДНК и располагается между ними.

Блеомицины — группа гликопептидных антибиотиков, образуемых *S. verticillus*. Группа объединяет не менее 16 близких по химическому строению антибиотиков.

В состав блеомицинов входят аминокислоты, амины, L-глюкоза и карбамоил- D-манноза.

Блеомицины — противоопухолевые антибиотики. Основной механизм их биологического действия — деградация молекулы ДНК. Блеомицины в зависимости от концентрации тормозят синтез ДНК и в меньшей степени синтез РНК. Высокая концентрация антибиотика (300 мкг/мл) приводит клетки к гибели.

Новобиоцин. Под действием новобиоцина происходит внутриклеточное накопление уридиннуклеотидов и подавление синтеза РНК. Антибиотик подавляет также клеточное деление и снижает содержание ДНК в растущих клетках.

Основной процесс в механизме биологического действия новобиоцина — подавление синтеза ДНК и в меньшей степени — РНК. Подавление синтеза белка, роста бактерий и увеличение проницаемости клеточной мембранны наблюдается на более поздней стадии биохимического воздействия новобиоцина и, возможно, представляет собой второй процесс, связанный с нарушением синтеза ДНК. Новобиоцин подавляет также синтез тейхоевой и тейхуроновой кислот.

Коумермицин А. По химическому строению этот антибиотик, в сущности, является димером новобиоцина. Как и новобиоцин, он подавляет синтез ДНК и РНК, ингибирует гиразу (фермент, участвующий в скручивании спирали ДНК). Однако для ингибирования гиразы концентрация коумермицина должна быть в 10 раз выше, чем новобиоцина.

Суммируя данные по ингибированию антибиотиками синтеза ДНК у микроорганизмов, следует отметить, что взаимодействие антибиотика с ДНК может происходить по следующим направлениям: а) поперечно-связанное ковалентное взаимодействие; б) встраивание в молекулу ДНК; в) нековалентное взаимодействие и г) деградация молекулы ДНК.

2.18 Лабораторная работа № 23 (2 часа).

Тема: «Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков»

2.18.1 Цель работы: выяснить механизм устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков.

2.18.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с причинами возникновения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.
2. Изучить факторы, связанные с проявлением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков»

2.18.4 Описание (ход) работы:

1. Ознакомиться с причинами возникновения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

При воздействии ряда антибиотиков на чувствительные к ним микроорганизмы неоднократно возникают формы, устойчивые к их действию. Особенно быстрая адаптация наблюдается под влиянием стрептомицина и пенициллина. Например, для повышения устойчивости к стрептомицину у *Erwinia 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 возникновение устойчивых форм микробов приобретает 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%.

Аналогичное положение наблюдалось и с другими антибиотиками.

Когда в начале 1950 г. в Японии были введены в медицинскую практику стрептомицин, тетрациклины и хлорамфеникол, устойчивые к этим антибиотикам штаммы *Shigella* составляли 0,04%, но постепенно мультирезистентные штаммы распространились и через 20 лет их число достигло 90%.

Резистентные к антибиотикам бактерии обнаружаются не только в клиниках при использовании этих биологически активных соединений в качестве лечебных препаратов, но и в естественных природных условиях. В некоторых регионах в фунтовых водах обнаруживается высокое содержание резистентных к антибиотикам форм кишечной палочки, хотя применение антибиотиков в этой местности было крайне ограниченным. Одной из возможных причин такого феномена, как отмечают С.М. Навашин и Ю.О. Сазыкин (1998), может быть «слабое селективное давление в результате какого-то, пусть небольшого, количества антибиотика в природной среде».

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. Для выяснения вопроса об эффективности препарата обычно используют диски бумаги, пропитанные антибиотиками. Диски накладывают на питательную агаровую пластинку, засеянную выделенным возбудителем, и после определения чувствительности организма к одному из антибиотиков последний следует назначать больному, разумеется, при условии, что препарат не противопоказан по каким-либо другим причинам. При использовании дисков фильтровальной бумаги для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам необходимо соблюдать стандартные условия опытов, и в первую очередь необходимый состав питательной среды и соответствующую концентрацию испытуемого антибиотика.

Возникновение форм, устойчивых к антибиотикам, делает проблему адаптации весьма важной.

Высказываются различные точки зрения на возможность появления устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов. По мнению некоторых авторов, одним из факторов, определяющих развитие устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, является мутационно-селекционный процесс. В основе этого механизма лежит селекция антибиотическими веществами мутантов, устойчивых к ним.

Однако вряд ли такой механизм устойчивости можно считать основным, так как возникновение спонтанных мутаций идет весьма медленно. Такие мутации возникают довольно редко. Кроме того, хромосомные мутанты обычно устойчивы к одному или нескольким препаратам, имеющим близкое химическое строение и однотипный механизм биологического действия.

Выполняя функции отбора резистентных форм микроорганизмов, возникших в результате спонтанного мутагенеза, антибиотики могут выступать в роли мутагенов, ускоряя процесс появления мутантов, устойчивых к антибиотикам. Мутагенными свойствами обладают такие антибиотики, как стрептомицин, мицерин, азасерин, митомицин С и др.

Появление форм, резистентных к антибиотикам, можно объяснить и гетерогенностью культур микроорганизмов. Одним из существенных факторов, определяющих гетерогенность микробной популяции, является диссоциация, состоящая из двух основных процессов: возникновения вариантов с высокой частотой, значительно превышающей уровень спонтанного мутационного процесса, и селекции возникающих вариантов под действием внешних условий.

В культуре микробы наряду с чувствительными клетками могут быть клетки, обладающие определенной степенью устойчивости к антибиотику. В этом случае антибиотическое вещество может выступать в роли фактора отбора устойчивых форм. Однако единой точки зрения, объясняющей механизм этого явления, нет. Одни авторы указывают, что гетерогенность микробной культуры обусловлена частым появлением устойчивых к антибиотику вариантов. Другие рассматривают явление гетерогенности в отношении некоторых производных пенициллина (метициллин, оксациллин) в качестве фенотипического фактора, определяемого условиями среды.

Наиболее вероятным генетическим механизмом возникновения резистентности бактерий к применяемым антибиотикам, отмечает С.В. Сидоренко (1998), служит селекция мутаций структурных генов мишней, на которые действуют антибиотики, а также приобретение детерминант резистентности с подвижными генетическими элементами от других видов микроорганизмов. В последнем случае, как правило, удается показать предсуществование таких детерминант на ранних стадиях эволюции 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.

2. Изучить факторы, связанные с проявлением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

1. *Состояние клеточной стенки, при котором она препятствует проникновению антибиотика внутрь клетки.* Свойство клеточной стенки задерживать проникновение антибиотических веществ внутрь клетки иллюстрируется на примере пенициллиноустойчивых стафилококков. Количество антибиотика, связанного клетками, определяется степенью чувствительности бактерий: чем чувствительнее организм, тем больше он связывает пенициллина. С другой стороны, иногда клетки чувствительных к пенициллину стафилококков становятся устойчивыми к нему, если они образуют колонии, защищенные внеклеточным покровом, который препятствует проникновению антибиотика непосредственно к клеткам.

Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к β -лактамным антибиотикам, возможно, связана со скоростью проникновения этих препаратов через внешнюю мембрану.

Возникновение устойчивости названных бактерий к карбапенемам, в частности к имипенему, может быть связано с уменьшением размеров пориновых каналов, через которые «в норме» быстро проникает антибиотик.

Устойчивость бактерий к стрептомицину и другим аминогликозидам может быть обусловлена ослаблением связи антибиотика с поверхностью клетки.

2. *Способность клетки разрушать антибиотик раньше, чем он сможет проявить свое биологическое действие.* Образование микробной клеткой веществ, способных инактивировать антибиотики, свойственно ряду микроорганизмов. Пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, хлорамфеникол и другие антибиотики легко разрушаются ферментами, продуцируемыми многими видами бактерий. Так, различные штаммы стафилококков, бактерии рода *Bacillus* и многие виды грамотрицательных бактерий образуют ферменты β -лактамазы, амидазы, инактивирующие молекулу пенициллинов, цефалоспоринов и других β -лактамных антибиотиков. Показано, что в клетках бактерий образование β -лактамаз кодируется как хромосомными генами, так и генами плазмид.

Стрептомицин и другие аминогликозидные антибиотики также могут инактивироваться ферментами микробной клетки.

Появление устойчивости к пенициллину у разных штаммов *B. cereus* связано с количеством образованной ими пенициллиназы (β -лактамазы).

Повышение устойчивости к бензилпенициллину и ампициллину (полусинтетическому пенициллину) наблюдается у штаммов *E. coli*, способных образовывать β -лактамазу. Существует корреляция между количеством β -лактамазы, вырабатываемой штаммами *E. coli*, и степенью их устойчивости к пенициллинам.

Бета-лактамазы, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, можно разделить на две группы: ферменты, кодируемые плазмидными генами, и

ферменты, кодируемые хромосомными генами. Первая группа энзимов характеризуется широким спектром действия, они способны гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины. Вырабатываются в высоких концентрациях. Ферменты второй группы образуются бактериями в незначительном количестве, гидролизуют или пенициллины, или цефалоспорины. Некоторые β -лактамные антибиотики могут индуцировать образование этих β -лактамаз.

Таким образом, устойчивость многих видов бактерий к пенициллину связана с образованием ими ферментов, разрушающих молекулу антибиотика (β -лактамазы, или пенициллинамидазы, или того и другого вместе).

Образование бактериями β -лактамаз — один из существенных факторов возникновения резистентности микроорганизмов к пенициллинам и другим β -лактамным антибиотикам.

Этот фактор резистентности, по данным Д. Вильямса (1997), определяет около 80% случаев устойчивости бактерий.

В целях предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к β -лактамным антибиотикам в результате инактивации препарата β -лактамазами совместно с антибиотиками применяют ингибиторы β -лактамаз (клавулановую кислоту, сульбактамы, тазобактам) или получают липосомные формы этих антибиотиков. В последнем случае защита антибиотиков от β -лактамаз происходит в результате включения β -лактама в положительно заряженные липосомы.

Резистентность микроорганизмов к хлорамфениколу может возникнуть в результате образования другого типа фермента (хлорамфеникол гидролазы), разрушающего молекулу этого антибиотика. Хлорамфениколгидролаза выделяется из мицелия стрептомицета, синтезирующего хлорамфеникол, а также вырабатывается рядом видов бактерий. Гидролиз антибиотика под действием хлорамфениколгидролазы идет с образованием биологически неактивного нитрофенилсеринола.

Основным механизмом внехромосомной устойчивости бактерий к аминогликозидам служит образование ими защитных ферментов (фосфотрансфераз, адениилтрансфераз, ацетилтрансфераз), инактивирующих аминогликозидные антибиотики.

Резистентность бактерий к эритромицину и его полусинтетическим аналогам (азитромицину, кларитромицину, рокситромицину) связана не только с уменьшением сродства антибиотиков с 50 S-субъединицей хромосомы, но и с образованием ферментов типа фосфотрансфераз.

3. Изменение клеточных структур (рибосом, мембран и др.) или модификация активных центров антибиотика, находящегося в клетке, под действием ряда факторов. Резистентность бактерий к β -лактамным антибиотикам обусловлена степенью диффузии препарата через внешнюю мембрану и сродством антибиотика к пенициллинсвязывающим белкам (PBP-ферментам, принимающим участие в построении клеточной стенки и являющимся основной мишенью действия β -лактамных антибиотиков).

Отмеченный механизм устойчивости к β -лактамным антибиотикам у различных групп микроорганизмов встречается примерно в 12% случаев. Резистентность микроорганизмов к названным антибиотикам может быть связана с наличием в перiplазматическом пространстве бета-лактамаз, инактивирующих эти антибиотики.

Устойчивость микроорганизмов к стрептомицину связана с тем, что под действием этого антибиотика изменяются рибосомальные белки. Указанный процесс кодируется хромосомными генами.

Аминогликозиды и хлорамфеникол повреждают рибосомный аппарат, а полипептидные антибиотики вызывают дезорганизацию функционирования мембран.

Под действием ряда факторов в клетках бактерий может происходить модификация структуры активных центров антибиотика. Например, в активном центре ванкомицина, находящегося в клетках бактерий, обнаружена замена валина на молочную кислоту, что приводит к невозможности контакта антибиотика с мишенью клетки. В результате возникает резистентность бактерий к ванкомицину.

Появление резистентности к эритромицину и другим макролидам, которая широко распространена в настоящее время, обусловлено метилированием участка связывания макролида с рибосомой стрептококка под действием фермента метилазы.

4. *Способность бактерий снижать концентрацию антибиотика внутри клетки.* Бактериальные клетки, чувствительные к антибиотикам, способны аккумулировать эти соединения внутри клеток. Резистентные же микроорганизмы благодаря системе энергозависимого выброса снижают концентрацию антибиотика внутри клетки и таким образом защищают себя от антибиотического действия этих соединений.

При широком использовании в медицинской практике карбапенемов возникновение резистентных форм *Pseudomonas aeruginosa* может быть связано с отбором мутаций, повышающих энергозависимый выброс антибиотика из клеток. Один из механизмов устойчивости стрептомицетов, вырабатывающих актиномицины, к действию собственных антибиотиков связан также с выносом синтезированного актиномицина из клеток мицелия в окружающую среду.

Выброс антибиотика из клетки осуществляется системой «насос-помпа», действующей при участии АТФ и под контролем соответствующих генов. «Насос» втягивает в себя антибиотик, который затем «перекачивает» в «помпу». Из «помпы» антибиотик выбрасывается из клетки.

Способностью удаления антибиотиков из клетки (эффлюкс) обладают многие виды бактерий, однако активность этого процесса различна у разных видов. Она зависит также и от строения молекулы антибиотика.

Такой механизм устойчивости бактерий имеет место в отношении антибиотиков тетрациклической группы, макролидов, карбапенемов и др. и занимает заметное место в повышении резистентности микроорганизмов. Гены, кодирующие транспортные системы активного выноса из клеток антибиотиков, обычно локализованы на плазмидах, что способствует их быстрому распространению.

5. *Нарушение мишени в микробной клетке, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику.* Изменение ответственного за чувствительность микробной клетки к антибиотику звена (мишени) — один из существенных факторов, определяющих появление резистентных форм. Известно, что в большинстве случаев в качестве мишени в микробной клетке для действия антибиотиков служат ферменты или белки с неясно выраженной энзиматической активностью.

Устойчивость грамположительных бактерий (стафилококков, энтерококков) к β-лактамным антибиотикам иногда связана с тем, что у этих бактерий происходит изменение конформации мишеней. Например, проявление резистентности у *Staphylococcus aureus* связано с возникновением нового пенициллинсвязывающего белка (PBP). Такая устойчивость получила наименование метициллинрезистентности.

Устойчивые к метициллину штаммы золотистого стафилококка и *Enterococcus faecalis* оказываются резистентными к цефалоспоринам широкого

спектра действия (III и IV поколений, стабильным к большинству β -лактамаз). Цефалоспорины, аналогично метициллину, не связываются с РВР.

В результате различных мутагенных воздействий на чувствительную к тому или иному антибиотику микробную клетку можно получить мутант с измененной ферментной системой, являющейся мишенью для антибиотика. Такой мутант может оказаться резистентным к антибиотику. Аналогичным путем были получены резистентные мутанты *E. coli* к таким антибиотикам, как новобиоцин, рифамицин и некоторые другие.

6. *Перенос генов антибиотикорезистентности от устойчивых штаммов микроорганизмов к чувствительным.* Такой перенос генов может происходить в результате конъюгации, трансдукции или посредством транслоцирующихся элементов, а также за счет мутаций в хромосомных и плазмидных генах.

Факторы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, связанные с переносом генов резистентности, впервые были обнаружены на примере *Shigella* в 1957 г. японскими исследователями. Позднее было установлено, что устойчивость штаммов бактерий к лекарственным препаратам определяется наличием плазмид, передаваемых при конъюгации.

Фактор устойчивости (К-фактор) — это комплекс генов; часть из них ответственна за устойчивость к одному антибиотику, например гентамицину, другие определяют устойчивость к другому антибиотику (стрептомицину), третьи облегчают «заражение» фактором устойчивости одной микробной клетки от другой.

В первые годы применения антибиотиков «инфекционная» устойчивость к ним встречалась редко. Но уже к 1965 г. до 60-70% всех широко распространенных бактерий кишечной группы были носителями К-факторов и проявляли устойчивость к трем или большему числу антибиотиков. Более того, К-факторам свойственно сообщать бактериям устойчивость одновременно к нескольким химически различающимся препаратам, например к сульфаниламиду, пенициллину и стрептомицину.

Плазмиды, несущие гены устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, обнаруживаются практически у всех групп патогенных бактерий. Поэтому частота резистентности к антибиотикам обусловлена, в первую очередь, распространением генов, детерминирующих устойчивость. Перенос генов устойчивости может происходить не только внутри клеток одного вида, но и у различных видов и родов микроорганизмов.

В результате широкого применения химиотерапевтических средств повсеместно распространяются К-факторы, так как они обладают мощными селекционными преимуществами, связанными со способностью придавать бактериям устойчивость одновременно ко многим (до восьми) лекарственным препаратам. Поэтому с прекращением использования на практике того или иного лекарственного препарата снижается и возможность появления устойчивых к нему форм бактерий.

Устойчивость бактерий к антибиотикам, обусловленная К-факторами, обнаруживается у микроорганизмов, не только выделенных из животных, от больных людей, принимавших антибиотики, но и полученных из природных мест обитания (загрязненных рек, озер). Отмечается, однако, что природные штаммы бактерий передают свои плазмиды с очень низкой частотой.

Наряду с плазмидами, ответственными за устойчивость бактерий к антибиотикам, в бактериальных клетках имеются так называемые мигрирующие элементы, одни из которых — транспозоны — сложные структуры, иногда содержащие дополнительные гены, связанные с резистентностью к антибиотикам. Но и сами продуценты многих антибиотиков способны служить источниками генов

резистентности, передавая их с помощью различных механизмов другим микроорганизмам, в том числе и патогенным.

Это подтверждается результатами исследований последнего времени, в которых показано, что гены, участвующие в биосинтезе ряда антибиотиков (аминогликозидов, эритромицина, актиномицинов и некоторых других), физически подобны генам, которые кодируют устойчивость к этим антибиотикам. Иными словами, производители антибиотиков имеют гены резистентности к собственным антибиотикам, одновременно проявляя устойчивость к другим антибиотикам. У многих видов стрептомицетов клонированы гены резистентности, основная часть детерминант которых расположена на хромосоме.

Некоторые гены, регулирующие резистентность, начинают функционировать только в присутствии соответствующих антибиотиков.

Распространению устойчивых форм микроорганизмов способствуют лечебные медицинские учреждения, промышленные предприятия по производству антибиотиков и другие места, связанные с массовыми контактами людей и животных с антибиотическими препаратами. Здесь антибиотики создают благоприятный фон для селекции и сохранения резистентных форм микроорганизмов. Массовая и активная миграция населения также способствует распространению названных форм микроорганизмов.

Приведенные данные подтверждают, что явление устойчивости бактерий к антибиотикам — сложный и многофункциональный механизм.

Большой фактический материал свидетельствует о том, что организмы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, могут оставаться чувствительными к действию других препаратов. Такое явление наблюдается в отношении антибиотиков, обладающих различным механизмом действия: пенициллинеустойчивые бактерии оказываются чувствительными к действию стрептомицина; стрептомициноустойчивые формы подавляются неомицином, хлортетрациклином и полимиксином; формы, резистентные к пенициллину и стрептомицину, восприимчивы к действию новобиоцина и т.д. Следовательно, антибиотики, различающиеся химическим составом и образуемые разными видами микробов, обладают неодинаковым механизмом биологического действия. Отличие в биохимической активности антибиотических веществ широко используется в химиотерапии: для предупреждения возникновения устойчивых форм применяют одновременно два или более антибиотика.

Однако бывают случаи, когда микробы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, становятся резистентными к действию других препаратов. Это *перекрестная устойчивость*, отмеченная для хлорамфеникола и тетрациклинов, для всех пенициллинов, полученных биосинтетическим путем, и некоторых других биологически активных веществ.

Перекрестная устойчивость отдельных видов микроорганизмов в отношении разных антибиотиков указывает на то, что механизм биологического действия этих веществ идентичен. Как правило, явление перекрестной устойчивости микробов обнаруживается у антибиотиков, близких по химическому составу, хотя есть и исключения, например хлорамфеникол и тетрациклины.

Нередко при концентрациях некоторых антибиотиков, значительно превышающих минимальные бактериостатические, рост всех клеток чувствительного к антибиотику микроорганизма не останавливается. При этом часть клеток способна расти и размножаться, наблюдается увеличение числа клеток и биомассы. В этом случае говорят о явлении «остаточного роста».

«Остаточный рост» не обусловлен возникновением устойчивых мутантов или популяционными сдвигами в сторону менее чувствительных клеток, а связан с медленным размножением части популяции. В этих условиях продолжают идти

процессы, непосредственно антибиотиками не затрагиваемые (синтез полисахаридов, липидов). Известно, что антибиотики, способные подавлять белковый синтез (хлортетрациклин, хлорамфеникол, эритромицин и др.), ингибируют этот процесс в клетках на уровне рибосом. Однако при относительно высоких концентрациях этих антибиотиков полного подавления синтеза белка не происходит; «остаточный синтез» белка составляет от 2 до 10%.

По всей вероятности, одной из причин «остаточного роста» чувствительных микроорганизмов в присутствии высоких концентраций антибиотиков, способных подавлять белковый синтез, может быть «остаточный синтез» белка в клетках.

Итак, под действием антибиотиков в микробной клетке происходит ингибирование вполне определенных звеньев (мишеней) метаболизма чувствительных к ним организмов. Блокирование той или иной мишени зависит как от химической структуры молекулы антибиотика, так и от особенностей строения клетки микроорганизма и происходящих в ней метаболитических процессов, контролируемых соответствующими генами.

2.19 Лабораторная работа № 24 (2 часа).

Тема: «Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков»

2.19.1 Цель работы: изучить основные группы побочных реакций при применении антибиотиков.

2.19.2 Задачи работы:

1. Изучить аллергические реакции при использовании антибиотиков
2. Изучить токсические реакции
3. Изучить реакции, обусловленные специфическим действием антибиотиков.
4. Рассмотреть основные пути предупреждения побочного действия антибиотиков.

2.19.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков»

2.19.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить аллергические реакции при использовании антибиотиков.

Аллергические реакции — наиболее частое проявление побочного действия антибиотиков. Эти реакции наблюдаются при применении практически всех антибиотиков. Однако чаще всего они возникают при применении антибиотиков пенициллиновой группы, так как в медицинской практике они самые распространенные.

Аллергические реакции развиваются как осложнение на аллерген (антибиотик); возникновение не зависит от дозы введенного антибиотика; могут последовать за первым введением антибиотика, сенсибилизация нарастает при повторных курсах лечения. Из реакций, опасных для жизни, может быть анафилактический шок и ангиноневротический отек горлани. Из реакций, не опасных для жизни — это кожный зуд, крапивница, сыпь, астматические приступы, ринит, конъюнктивит, эозинофилия.

«Реакция на пенициллин, — отмечают А.В. Смольянников и П.Ф. Калитеевский (1989), — может появиться даже у тех, кто заведомо не принимал ранее пенициллина, скажем у грудного ребенка, получающего молоко матери, леченной пенициллином, или после употребления обычного коровьего молока,

стабилизированного этим препаратом... Известны случаи, когда женщины реагировали на сперму мужчин, получавших лечение пенициллином».

Дж. Касик и Дж. Томпсон (1970) приводят данные, показывающие, что аллергические реакции к пенициллину проявляются в 14 случаях из 10000 больных. Что касается смертельных случаев при анафилактических реакциях как наиболее серьезных форм немедленной реакции организма на вводимый в виде инъекции пенициллин, то эти авторы определяют их довольно приблизительно: одна смерть на 10000 больных, применявших пенициллин.

2. Изучить токсические реакции.

Токсические реакции характерны для многих групп антибиотиков. Аминогликозиды (стрептомицин, неомицин, мономицин) обладают относительно высокой токсичностью. Такие антибиотики, как хлорамфеникол, группа ванкомицина — ристомицина и некоторые другие, проявляют токсическое действие, связанное с кроветворением. Тетрациклические антибиотики, макролиды отличаются гепатоксическим действием.

Возникновение токсических реакций связано с органотропным фармакодинамическим действием антибиотиков. Степень выраженности зависит от продолжительности лечения и дозы препарата.

Из реакций, опасных для жизни, может быть токсическое действие на кровь, агранулоцитоз, апластическая анемия. Из реакций, не опасных для жизни — это поражение VIII пары черепно-мозговых нервов, периферических нервов, нефротокическое действие: тошнота, рвота, понос.

Обобщая данные о токсичности используемых в медицинской практике антибиотиков, можно указать на следующие реакции: ототоксичность, нервно-мышечная блокада, неврологическая токсичность, нарушение функций крови, печени, желудочно-кишечного тракта и др.

3. Изучить реакции, обусловленные специфическим действием антибиотиков.

Осложнения, связанные со специфическим антимикробным действием антибиотиков, происходят в результате нарушения равновесных экосистем организма человека. От этого зависят возникновение дисбактериозов и нарушение витаминного баланса организма, вторичные инфекции, вызываемые резидентными к антибиотикам формами возбудителей. Такие осложнения могут проявляться как у взрослых людей, так и у детей. О некоторых осложнениях упоминалось при рассмотрении отдельных антибиотиков. Здесь же будут названы те негативные реакции, о которых не было сказано ранее.

Так, тетрациклические антибиотики могут накапливаться в костях и нарушать их рост. Это особенно заметно проявляется у детей, длительное время принимавших указанные антибиотики. Хлорамфеникол и стрептомицин могут вызывать поражение костного мозга и нарушать процесс кроветворения (гипопластическая анемия). Противоопухолевые антибиотики из группы антрациклинов, в том числе адриамицин (доксирибуцин), вызывают нарушение генетического аппарата не пораженных опухолью клеток организма.

4. Рассмотреть основные пути предупреждения побочного действия антибиотиков.

Для уменьшения числа серьезных побочных реакций, вызываемых антибиотическими веществами, необходимо строго соблюдать оправдавшие себя основные принципы рационального применения антибиотиков, заменять препараты, обладающие токсичным действием, менее токсичными. Рациональная и безопасная антибиотикотерапия предусматривает всесторонний учет свойств антибиотических веществ, применяемых на практике, особенностей микроорганизма, вызывающего заболевание, и организма больного.

Основной путь предупреждения побочного действия антибиотиков связан с применением рациональной антибиотикотерапии, которая, по мнению Э.А. Бабаяна (1977), определяется тремя основными факторами:

- 1) выбором препарата с учетом его фармакологических свойств и спектра действия;
- 2) выделением, идентификацией и определением чувствительности бактериальной флоры к антибиотику;
- 3) выявлением или предупреждением повышенной чувствительности больных к выбранному антибиотику.

При применении антибиотиков необходимо учитывать индивидуальные особенности больного. Игнорирование этого важнейшего правила в отдельных случаях приводит к нежелательным последствиям, связанным с тяжелыми побочными явлениями.

2.20 Лабораторная работа № 25 (2 часа).

Тема: «Антибиотики в растениеводстве»

2.20.1 Цель работы: изучить антибиотики, применяемые в растениеводстве

2.20.2 Задачи работы:

1. Изучить механизм действия антибиотиков на растения и методы их использования.
2. Изучить антибиотики для борьбы с фитопатогенными организмами.

2.20.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики в растениеводстве»

2.20.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить механизм действия антибиотиков на растения и методы их использования.

Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в борьбе с фитопатогенными организмами, наносящими ущерб сельскому хозяйству.

Известно, что заболевания растений вызываются разными группами фитопатогенных организмов: вирусами, бактериями, грибами, простейшими и др. Поражение растений происходит как при развитии в полевых условиях, в садах, так и в теплицах и оранжереях.

Источниками заражения растений фитопатогенными организмами могут быть семена (с наружной и внутренней инфекцией), растительные остатки, посадочный материал (черенки, саженцы, клубни, корнеплоды) и сама почва.

Биологические средства защиты растений по сравнению с химически синтезированными препаратами (пестицидами) экологически более чистые и безвредные. Поэтому им в последнее время отдается предпочтение.

При выборе антибиотика для борьбы с возбудителем заболевания и очагом его распространения, а также способа применения препарата основное внимание обращают не только на биологический эффект, но и на экономическую сторону, и на экологические аспекты. Назначение препарата и метод его применения должны быть экономически выгодны и экологически безвредны.

Основные требования, предъявляемые к антибиотикам, используемым в борьбе с фитопатогенными организмами, сводятся к следующему: 1) антибиотик должен быть активным в отношении возбудителя заболевания, т.е. обладать специфичностью биологического действия; 2) легко проникать в ткани растений; 3)

лечебные дозы должны быть безвредными для растения; 4) антибиотик на поверхности и внутри растения должен медленно инактивироваться, но, попадая в почву, легко разлагаться там; 5) обладать биологическим действием внутри тканей растения; 6) не наносить ущерба окружающей среде.

Одно из существенных требований к антибиотикам, применяемым в сельском хозяйстве, то, что они не должны использоваться в медицинской практике во избежание возникновения и распространения резистентных к ним форм микроорганизмов.

Методы использования антибиотиков выбирают в зависимости от вида заболевания (сосудистый вилт, поражение листьев и др.), стадии развития растения, размеров растения, места произрастания и способа посадки. Наиболее широкое применение имеют непосредственная обработка почвы, обрызгивание или опыление антибиотиком наземных частей растений, смачивание семян, корней или других органов растворами антибиотиков и др.

Все приемы использования антибиотиков основаны на том, что препарат, нанесенный на поверхность листьев, ствола (стебля), семян или же внесенный в почву, задерживает рост фитопатогенных организмов, находящихся как на поверхности, так и внутри органов и тканей растения, или убивает эти микроорганизмы.

Антибиотики, нанесенные на наземные части растений или внесенные в почву, проникают в растение через корневую систему, стебель или листья и довольно быстро расходятся по растению. Однако такие антибиотики, как гризофульвин, распространяются по тканям и органам растения очень медленно.

Попав в растение, антибиотики сохраняются в его тканях сравнительно долго — от 5 до 20 сут.

Внесение антибиотиков в почву. Растворы антибиотиков, внесенные в почву, поглощаются корневой системой растений и через некоторое время в зависимости от вида растения и свойств антибиотика обнаруживаются как в тканях корней, так и в наземных частях.

При погружении корневых систем в растворы антибиотиков уже через 10-20 мин препараты обнаружаются в различных органах растений. Установлено, что пенициллин накапливается в листьях избирательно. При обработке семян антибиотиками последние быстро проникают в оболочку и зародыш и сохраняются там продолжительное время.

При внесении антибиотиков в почву в целях борьбы с фитопатогенными организмами встречается ряд серьезных препятствий. Прежде всего, в почве эти соединения быстро разрушаются под влиянием продуктов жизнедеятельности почвенных микробов и по другим причинам, а также потребляются почвенными организмами в качестве питательных веществ. Многие антибиотики основной природы необратимо адсорбируются коллоидами почвы, поэтому внесение их непосредственно в почву в ряде случаев может оказаться нерентабельным.

Опрыскивание пораженных растений растворами антибиотиков. Метод может быть использован на протяжении всего периода вегетации таких растений, как фруктовые деревья, овощи и другие сельскохозяйственные культуры. Опрыскивание растений антибиотиками оказывает защитное действие против мучнистой росы огурцов, также его применяют в борьбе с *Xanthomonas juglandis*, вызывающим заболевание грецкого ореха, и с *X. vesicatoria*, поражающим томаты и перец.

Метод опрыскивания — один из наиболее эффективных в борьбе с болезнями растений, возбудители которых развиваются как на поверхности наземных органов, так и в тканях растений.

Опыление пораженных растений антибиотиками. Этот метод также широко применяется в растениеводстве, однако он менее эффективен по сравнению с методами опрыскивания.

Погружение зараженных органов растений в раствор антибиотика. Метод широко распространен, например, в борьбе с поражениями семян, фруктов, клубней и корнеплодов. Интересные результаты применения этого метода получены при обработке семян хлопчатника для защиты растений от гоммоза, вызываемого *X. malvacearum*.

Метод инъекций, или метод штамбов, используется иногда при лечении отдельных древесных пород. В стволе дерева просверливают отверстие и в него вставляют конец фитиля, а другой конец помещают в раствор антибиотика. По фитилю антибиотик поступает в ткань дерева и распространяется по всему растению. Впервые метод штамбов был предложен И. Шевыревым в 1903 г.

Антибиотики, попадая в ткань растений, действуют не только как бактерициды. Они могут также изменить метаболизм и иммунобиологические свойства растений.

Из большого числа антибиотиков, испытанных в целях применения их для борьбы с различными заболеваниями растений, вызываемыми бактериями и грибами, наибольший эффект наблюдался при использовании гризофульвина, циклогексамида (актидиона) и некоторых других.

В растениеводстве антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений. Преимущество антибиотиков как продуктов жизнедеятельности организмов по сравнению с биологически активными препаратами, полученными в результате химического синтеза, состоит в том, что они не загрязняют окружающую среду. В природе антибиотики быстро разлагаются. Вместе с тем возникновение и распространение форм микроорганизмов, резистентных к антибиотическим веществам, требует поиска и подбора для растениеводства таких антибиотиков, которые не применяются в медицинской практике.

2. Изучить антибиотики для борьбы с фитопатогенными организмами.

В настоящее время для борьбы с фитопатогенными организмами в разных странах применяют разные антибиотические вещества или их сочетания.

Гризофульвин используется в борьбе против заболеваний растений, вызываемых грибами, и прежде всего *Botrytis*. Антибиотик активен в отношении возбудителей ржавчины, мучнистой росы.

Трихотецин способен подавлять развитие ряда фитопатогенных организмов, в том числе *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium*.

Однако в ряде случаев трихотецин не дает положительного эффекта. Так, он не проявляет заметного защитного действия при вертициллезном вилте хлопчатника. Это связано с тем, что фитопатогенные грибы, устойчивые к действию трихотецина, во многих случаях образуют эндогенный фермент трихотециназу, инактивирующий антибиотик. Наиболее сильно свойством инактивировать трихотецин обладают грибы родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Бластицидин S — антибиотик, образуемый *Streptomyces griseochromogenes*, подавляет рост многих микроорганизмов в концентрации 50-100 мкг/мл. Он оказался эффективным в борьбе с пирикуляриозом — распространенной в Японии опасной грибной болезнью риса, вызываемой *Piricularia oryzae*. Однако этот антибиотик в определенной степени токсичен для человека.

В настоящее время бластицидин в борьбе с пирикуляриозом заменен более эффективным и безвредным для человека *касугамицином*, продуцируемым *Streptomyces kasugaensis*.

Минимальная концентрация касугамицина, необходимая для подавления гриба *P. oryzae* при рН окружающей среды ниже 6,0, составляет менее 1 мкг/мл, т.е. по сравнению с бластицидином S она ниже в 50-100 раз.

Полиоксины — группа, включающая девять антибиотиков. Эти антибиотики имеют своеобразное химическое строение и относятся к пептидилпиримидиннуклеозидным соединениям. Они обладают противогрибной активностью. Антибиотики подавляют рост фитопатогенных грибов, относящихся к *Alternaria*, *Cochliobalus*, *Piricularia*. Механизм действия полиоксинов основан на подавлении синтеза хитина клеточной стенки чувствительных грибов.

Валидамицин A образуется *S. hygroscopicus* subsp. *limoneus*. Антибиотик применяется в Японии для борьбы с заболеваниями риса, вызываемыми грибом *Rizoctonia solani*. Валидамицин легко разлагается почвенными микроорганизмами. Время его полуразпада в почве — менее 4 ч.

Тетранактин A — антибиотик, образуемый *S. aureus* и накапливающийся в мицелии продуцента. Это антибиотическое вещество принадлежит к классу макротетралидных антибиотиков. Тетранактин А обладает специфической активностью в отношении паразитарных паучков и клещей плодовых деревьев. Вместе с тем он очень слабо токсичен для теплокровных животных.

Препарат **полунактин**, состоящий из смеси макротетралидных антибиотиков, используется в качестве средства для борьбы с клещами.

Турингин — антибиотическое вещество, образуемое *Bacillus thuringiensis*. Это экзотоксин нуклеозидного строения. Он обладает инсектицидной активностью. *Bacillus thuringiensis* вырабатывает также β -экзотоксин, являющийся структурным аналогом АТФ, который может выступать в качестве конкурента АТФ в реакциях за связь с определенным участком на некоторых ферментах. β -Экзотоксин используется в качестве инсектицидного вещества в ряде бактериальных препаратов, например в битоксибациллине.

К антибиотикам, обладающим гербицидной активностью, относятся гербицидины А и В, образуемые *S. sagonoensis*. Эти антибиотики подавляют развитие возбудителя болезни риса *X. oryzae*. Гербицидин А инактивирует прорастание семян риса и китайской капусты, обладает избирательной гербицидной активностью в отношении двудольных растений.

По химическому строению гербицидины А и В относятся к нуклеозидам, а по гербицидной активности близки к тойокамицину (пирамицин, наритецин), образуемому культурами *S. toyosensis*, *S. chrestomyceticus*.

Механизм биологического действия гербицидинов и тойокамицина связан с тем, что они, являясь аналогами аденоцина, внедряются в полинуклеотиды и образуют физиологически неактивные нуклеиновые кислоты.

В последние годы проявляется значительный интерес к гербициду биалафосу, полученному в начале 80-х гг. японскими исследователями из культуры *Streptomyces hygroscopicus*. По своей структуре этот антибиотик представляет трипептид, состоящий из двух остатков L-аланина и L-глутаминовой кислоты — аналога фосфинотрицина.

Среди антибиотиков, выпускаемых отечественной промышленностью и используемых для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами, можно назвать следующие препараты.

Фитобактериомицин, образуемый культурой *Streptomyces lavendulae*, штамм 696. Подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий и ряда фитопатогенных микроскопических грибов.

Полимицин — антибиотик, принадлежащий к той же группе стрептотрицинов. Впервые выделен Н.К. Соловьевой с сотрудниками в 1960 г. из культуры *S. polymycini*.

Оба антибиотика применяются при обработке семян перед посевом. Семена замачивают в водном растворе, содержащем 0,005-0,01% препарата. Этим же раствором можно опрыскивать растения.

2.21 Лабораторная работа № 26 (2 часа).

Тема: «Антибиотики в животноводстве»

2.21.1 Цель работы: изучить антибиотики как стимуляторы роста животных.

2.21.2 Задачи работы:

1. Изучить антибиотики, используемые в животноводстве как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птиц.
2. Изучить действие антибиотиков на микрофлору кишечника животных.
3. Изучить непосредственное действие антибиотиков на организм животного.

2.21.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики в животноводстве»

2.21.4 Описание (ход) работы:

1. Изучить антибиотики, используемые в животноводстве как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птиц.

Антибиотики начали применять в животноводстве вскоре после их открытия. Прежде всего они нашли широкое применение в ветеринарии как лечебные средства против многих заболеваний сельскохозяйственных животных.

Антибиотики используются в животноводстве как стимуляторы роста ряда сельскохозяйственных животных и птиц.

Небольшие концентрации антибиотиков, применяемые в качестве добавок к корму животным, не оказывают отрицательного влияния на организм и качество продукции.

Использование антибиотиков в кормлении животных дает положительный эффект в птицеводстве, свиноводстве, при выращивании телят и других сельскохозяйственных животных. Добавление этих веществ к рациону птиц способствует ускорению их роста, снижению отхода молодняка; антибиотики стимулируют яйценоскость и повышают оплодотворяемость птиц. Введение небольшого количества антибиотиков в корм способствует повышению массы тела за период выращивания на 200-250 г на каждого цыпленка и до 350 г на каждого утенка. При использовании антибиотиков в птицеводстве можно заметно увеличить яйценоскость и от 1000 кур получить в год дополнительно 15 тыс. яиц.

Аналогичные результаты отмечаются при использовании антибиотиков в кормлении свиней, телят и других животных. Так, поросята, получавшие с кормом антибиотики, в двухмесячном возрасте весят на 1,5-1,7 кг больше, чем контрольные.

Антибиотик *норсеготрицин* выделен из культуры *S. noursei* и относится к группе стрептотрицинов. Он используется в качестве кормовой добавки при выращивании свиней и обеспечивает прирост живой массы поросят в пределах 5-15% при снижении затрат корма на 3-5%.

Применение антибиотиков при откорме свиней способствует получению дополнительно 100-120 ц свинины от каждой тысячи животных.

В качестве стимулятора роста сельскохозяйственных животных используется моненсин. Он понижает образование метана метаногенными бактериями, размножающимися в рубце жвачных животных, в результате чего

увеличивается количество летучих кислот, особенно пропионовой, легко и быстро усваиваемых животными.

По данным Е. Липинской, в качестве стимулятора роста молодняка сельскохозяйственных животных можно использовать полипептидный антибиотик низин, образуемый *S. 1actis*.

Для сельскохозяйственных нужд организовано производство кормовых антибиотиков на базе отходов (барда) спиртовых заводов с добавкой развара пшеничной муки. Получаемые препараты называются БКВ (биомицин кормовой витамилизированный).

Вопросам влияния низких концентраций антибиотиков на рост животных посвящено большое число исследований. Однако механизм стимулирующего действия этих веществ до конца не выяснен. По-видимому, стимулирующий эффект низких концентраций антибиотиков на организм животного связан в основном с двумя факторами: 1) с действием на микрофлору кишечника и 2) с непосредственным влиянием на организм животного.

2. Изучить действие антибиотиков на микрофлору кишечника животных.

На микрофлору кишечника действие антибиотиков сводится к следующему:

1. антибиотики способствуют увеличению числа полезных микроорганизмов, синтезирующих витамины и преобладающих над патогенными формами.

2. уменьшают число вредных для организма микробов, использующих витамины, образующих токсины и способные к патогенности или к условной патогенности.

3. оказывают влияние на микроорганизмы, присутствующие в кишечнике, способствуя образованию устойчивых штаммов, которые оказываются менее вредными для животного, изменяют метаболизм микробов, изменяют энергию потребления веществ в рубце, снижают активность нормальной флоры и повышают чувствительность к фагоцитозу.

4. способствуют перемещению микроорганизмов в кишечнике животного.

5. снижают субклинические инфекции, нередко замедляющие развитие молодняка, повышают общий тонус защитных реакций организма.

6. снижают pH кишечного содержимого, уменьшают поверхностное натяжение клеток организма и ускоряют их деление.

Все это благоприятно действует на организм животного и способствует более быстрому росту при одних и тех же затратах кормовых единиц.

3. Изучить непосредственное действие антибиотиков на организм животного.

Действие антибиотиков на рост животных прежде всего связано с изменением кишечной микрофлоры под влиянием этих веществ. Однако данные более позднего периода исследований указывают на непосредственное влияние антибиотиков на организм животного. Прямое действие этих веществ на организм проявляется в многообразных формах.

1. ткани увеличивают скорость абсорбции и стимулируют потребление метаболитов, одновременно с этим снижается расход кормов.

2. в организме отмечается синергизм гормонов, увеличивается количество ростовых гормонов, усиливается процесс потребления пищи, возрастает приспособляемость организмов к неблагоприятным условиям.

3. под влиянием антибиотиков снижается потребность животного в витаминах, увеличивается синтез витаминов тканями, стимулируется синтез сахаров и витамина А из каротина. Организм меньше образует побочных продуктов, увеличивается скорость синтеза ферментов, снижается образование метана, возрастает количество летучих кислот, которые легко усваиваются животными.

Таким образом, стимулирующее действие суббактериостатических доз антибиотиков на организм животных, и особенно молодняка, связано со многими факторами. Специфической же особенностью этих физиологически активных веществ следует считать их действие на микробный метаболизм пищевого тракта животных. Но эффективность антибиотиков и других микробных продуктов метаболизма обусловлена особыми веществами роста, или стимуляторами.

Применение антибиотиков в животноводстве неуклонно расширяется. Однако такая тенденция способствует увеличению числа микроорганизмов, несущих множественную антибиотикорезистентность, что, в свою очередь, создает условия для передачи устойчивости микроорганизмов от животных к человеку. Поэтому к проблеме использования антибиотиков в животноводстве следует подходить очень осторожно, учитывая возможные отрицательные последствия.

2.22 Лабораторная работа № 27 (2 часа).

Тема: «Антибиотики в пищевой промышленности»

2.22.1 Цель работы: изучить антибиотические вещества, применяемые в пищевой промышленности.

2.22.2 Задачи работы:

1. Использование антибиотиков при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы.
2. Антибиотики и сохранение молока и молочных продуктов.

2.22.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методические указания «Антибиотики в пищевой промышленности»

2.22.4 Описание (ход) работы:

1. Использование антибиотиков при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы.

Быстрая порча мясных туш связана с микрофлорой, содержащейся в пищевом тракте животного и попадающей в тушу при разделке ее после убоя или в кровеносную систему и лимфатические узлы в результате использования средств убоя. Для борьбы с нежелательной микрофлорой, попадающей в тушу и вызывающей ее преждевременную порчу, применяют два основных метода: 1) антибиотик добавляют в пищу животному непосредственно перед убоем; 2) антибиотик вводят в кровеносную систему сразу же после того, как животное забито и спущена кровь. Обработка антибиотиками позволяет значительно увеличить срок сохранности свежего мяса (до 2-3 сут) и улучшить его качество.

Микроорганизмы, вызывающие порчу мяса, могут попасть на поверхность туш из воздуха. Поэтому опрыскивание разделанных и охлажденных говяжьих туш раствором антибиотика или обработка антибиотиком брюшной полости свиней также способствует удлинению сроков хранения мяса.

Иногда для упаковки скоропортящихся продуктов применяют пленки и другие материалы, содержащие антибиотики. Это также удлиняет сроки хранения таких продуктов.

Огромное значение для народного хозяйства имеет проблема удлинения сроков хранения свежей рыбы, особенно при промысле в районах, расположенных далеко от берега и баз. Широкое использование для этих целей антибиотиков осуществляется следующими способами.

1. Погружение рыбы на 1-5 мин в морскую воду, содержащую хлортетрациклин в концентрации 5-100 мг/л.
2. Погружение рыбы в охлажденную до 1-1,5 °С морскую воду с содержанием в ней всего 2 мг/л хлортетрациклина.

3. Содержание рыбы на льду, в составе которого имеется хлортетрациклин в концентрации 1-2 мг/л воды.

2. Антибиотики и сохранение молока и молочных продуктов.

В производстве и хранении сыров, а также при хранении молока используется антибиотик низин, образуемый различными штаммами молочнокислых стрептококков. Низин обладает узким спектром антимикробного действия, подавляет развитие клоstrидиальных и других форм бактерий, участвующих в порче сыров.

При пастеризации молочных продуктов, используемых для приготовления сыров, создаются благоприятные условия для развития клоstrидиев, приводящих к порче сыра в результате образования газа или токсинов.

Применение низина или непосредственно культур, образующих его, предохраняет сыры от преждевременной порчи.

Несмотря на заманчивые перспективы использования антибиотиков в кормлении животных, при сохранении продуктов питания необходимо очень осторожно и внимательно относиться к их применению. Попадание даже незначительных концентраций этих биологически активных веществ с продуктами питания в организм человека может вызвать у него развитие резистентных форм микроорганизмов, что затруднит применение антибиотиков в случае заболевания; кроме того, это может быть причиной возникновения дисбактериозов и аллергических реакций.