

POLYMERASE CHAIN REACTION AS AN ASSAY FOR MONITORING AND DIAGNOSTICS OF REPRODUCTIVE FUNCTION DISTURBANCES IN LIVESTOCK

Shabunin S.V., Efanova L.I., Pasko N.V.

Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia

Abortion fetuses, sheath's outwashes of sows and heifers, and boars' sperm were examined by polymerase chain reaction. We established that they had been infected simultaneously by several pathogens as a rule. In pigs, the major role in reproductive pathology play SRRS, SCV-2, chlamidia, mycoplasmas and, less often, campilobacteria; in cows there were BHV, VD, chlamidia and, more seldom, PF-3 and campilobacteria.

УДК 619:615.28:665.65

МЕТОДОЛОГІЧНІ ТА МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ЩОДО СИНТЕЗУ І СКРИНІНГУ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ПРОТИМІКРОБНОЇ СПРЯМОВАНОСТІ

Шатіло Ю.В., Волянський А.Ю., Воропай А.Ю., Вальчук С.І., Руденко Л.М., Волков А.О., Мізін В.В., Волков Т.О., Кучма І.Ю.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, м. Харків

Означено сучасні методологічні та методичні підступи щодо направленої синтезу, мікробіологічного, фармакологічного та токсикологічного скринінгу хімічних речовин, на основі яких в найближчій перспективі є можливим конструювання нових, більш ефективних та менш токсичних протимікробних засобів різного походження.

Методологічні аспекти синтезу нових хімічних сполук з протимікробною дією передбачають, перш за все, мікробіологічний скринінг. Не дивлячись на наявність вельми широкого арсеналу протимікробних засобів, потреба в нових, більш ефективних і менш токсичних, очевидна і сьогодні, і в оглядовому майбутньому. Вказане обумовлено цілим рядом вагомих причин, серед яких на першому плані стоїть інтенсивне розповсюдження штамів збудників інфекційних та гнійно-запальних процесів, полірезистентних до хімотерапевтичних засобів, що вже широко використовуються в медичній та ветеринарній практиці. Антибіотики природного походження, які в більшості випадків являють собою препарати вибору по специфічній дії, частіше за інші хімотерапевтичні препарати призводять до формування і дисемінації стійких варіантів інфекцій, які були викликані клінічно та епідеміологічно значущими збудниками [1 - 3].

Розповсюдженням напрямком удосконалення підступів до раціональної хімотерапії є модифікація антибіотиків, які на протязі десятиріч використовувалися в практиці, з метою підвищення природної їх активності та ефективного використання в новій якості. Враховуючи, що стійкість мікробів до них базується на хромосомних мутаціях і/або генетичних змінах плазмідного характеру, в тому чи іншому випадках мова іде про зміну субклітинних молекулярних структур ДНК. Одним з перспективних способів боротьби з поширенням резистентності мікробів є використання ДНК-тропних сполук в якості одного з компонентів (добавки) лікарської форми антибіотику. Вказані ДНК-тропні сполуки (наприклад, похідні хінолону і акридину) з вираженими потенційними можливостями елімінації плазмід резистентності вже достатньо вагомо зарекомендували себе і цей напрямок інтенсивно розробляється ученими далекого та близького зарубіжжя [4]. На превеликий жаль, в Україні зустрічаються лише поодинокі роботи по проблемі компонування лікарських форм антибіотиків з елімінаторами К.-плазмід. Завданням нашого дослідження є заповнення цієї прогалини.

Експериментально доведено можливості похідних акрихіну, акрифлафіну та акридину в низьких дозах попереджувати стійкість до аміноглікозидів, рифампіци-

ну та оксациліну [5-6]. Однак, широке використання деяких з похідних вказаних груп хімічних сполук в медичній практиці обмежено їх вираженою токсичністю.

Дослідження антимутагенної дії більш як двохсот похідних акридину дозволило авторам [7]- означити її залежність від активного центру алкільного бокового ланцюга та змін локалізації аміногрупи в акридиновому ядрі, а також введення різних радикалів в хінолінове кільце. Доведено антимутагенну дію 3,6-аміноакридину, бромистого етидію та деяких бензоакридинів.

Безсумнівна перспективність та доцільність пошуку біологічно активних сполук, які в мікродозах на субстатичній основі інгібують прояви життєво важливих функцій мікробної клітини, та потенціюють бактерицидну дію вже давно відомих протимікробних засобів, що в якійсь мірі втратили свою ефективність [8-9].

Синтетичні протимікробні засоби, які по суті є ксенобіотиками, в своїй більшості позбавлені негативних якостей антибіотиків (токсичність, швидке формування резистентності тощо), принципово можуть успішно з ними конкурувати. Та поки що мало відомих груп хімічних речовин і оригінальних індивідуальних препаратів, що в повному об'ємі відповідають вказаним потребам. Слід активізувати їх пошук, скринінг та дослідження. Враховуючи, що синтез нових хімічних сполук вельми дорогий, а традиційний підступ емпіричного пошуку активних речовин подовжений в часі, акцентуємо увагу на перспективності спрямованого їх синтезу на основі математичного прогнозування та моделювання. Ще за радянських часів в Інституті ВНДІПАР (Москва) було створено банк даних щодо зв'язків «структура-активність». всі синтезовані хімічні сполуки реєструвались, паспортизувались, за направленістю специфічної дії класифікувались і I подальшому всебічно досліджувались. На превеликий жаль, в Україні на сьогодні аналогічна система не функціонує, по цьому синтез, вивчення та скринінг біологічно активних речовин проводиться лише за ініціативи окремих дослідників без творчої співдружності хіміків-синтетиків, математиків (моделювання), біофізиків, фармакологів і фармацевтів, технологів, фахівців різних галузей медицини та ветеринарії, токсикологів гігієністів тощо.

Слід акцентувати увагу і на тому, що відомі методологічні та методичні підступи до проблеми пошуку протимікробних засобів дозволяють лише відносно коректно прогнозувати фармакологічну активність та ступінь впливу на мікроорганізми вже синтезованих хімічних речовин.

Безсумнівно, що шлях удосконалення процесу мікробіологічного скринінгу залежить від реальних кроків до оптимізації відомих способів відбору активних сполук з використанням критеріїв доступності та дешевизни методик, швидкості означення ступеню і особливостей протимікробної дії, достатньо високої відтворюваності вже проведених досліджень.

На сьогодні загальноприйнято експериментальне вивчення нової хімічної речовини з передбачуваною протимікробною дією проводити за двома напрямками: попередньо - на тест-штамах обмеженого кола грампозитивних та грамнегативних бактерій і грибів; більш розширено (для самих активних речовин) - на музейних та клінічних штаммах різних родин, родів і видів (в залежності від цілеспрямованості пошуку).

Фармакологічна дія та токсикологічні властивості досліджуються у препаратів, які володіють прийнятною для експериментатора в узгодженні з поставленим завданням протимікробною активністю (широкий ачи, навпаки, вузький спектр дії; тип дихання мікробів, які чутливі до хімічної речовини; відношення до фарбування по Граму тощо) [10-12].

Слід підкреслити, що не дивлячись на ультраструктурні відмінності мікроорганізмів різної родинної приналежності та тканин організму тварин і людини, саме бактерії являють собою первинну, вельми чутливу та зручну мішень для вивчення біологічно активних синтетичних речовин. Вказане пов'язане також з їх порівняно простою структурою мікробів, великою швидкістю розмноження, універсальністю біохімічних реакцій і метаболізму, та й дешевизною, що на сьогодні в умовах екологічної кризи в Україні, Росії, багатьох країнах Європи і Америки вельми важливо.

Багаторічними скринінговими дослідженнями сполук синтетичного і природного походження для різних груп речовин доведено кореляційні зв'язки між антимікробними та іншими видами біологічної активності: антигістамінної, аналізуючої, протиабра кової, ранозагоювальної, імунотропної тощо. Вказане підтверджують і опубліковані в останні роки дані хіміків-органіків та фармакологів [13-14], що диктує необхідність для орієнтовної оцінки біологічного ефекту нових речовин різного фармакологічного спрямування використовувати в початковій схемі мікробіологічні дослідження іп УІГГО. Такі експерименти дозволяють здійснити обґрунтований вибір оптимальної методики, яка б поєднувала максимальну інформативність зі зручністю виконання, скомпонувати набір тест-культур мікроорганізмів, які представляють різні у систематичному відношенні групи.

Якщо йдеться про первинний відбір речовин з невідомою активністю, то загальноприйняті методи (серійних розведень, дифузії в агар) можуть бути застосовані з мінімальним набором тест-культур - референт-штамів патогенних та умовно патогенних грампозитивних/грамнегативних бактерій і грибів: золотистого стафілококу, кишкової палички та дріжджеподібних грибів роду *Capsicia albica*. Всі вказані мікроорганізми на сьогодні клінічно значущі і з кожним роком проявляють себе все агресивніше.

Відбір біологічно активних речовин в значній мірі визначається їх попередньою фізико-хімічною характеристикою, розчинністю в воді та органічних розчинниках, дифузійною здатністю. Вельми цінними є і деякі інші властивості, більш біофізичного характеру тощо. Наприклад, доведено зв'язок між флуоресцентними й антимікробними властивостями акридинової похідних, замішених 7-нітро і 7-діетилсульфамойлтиоакридину. Збільшення ступеня флуоресценції у них знаходилося у пропорційно оберненій залежності від вираженості антимікробної активності, нівелюючись при показниках МПЖ (мінімальної переважної концентрації) 3,9 - 7,8 мкг/мл у відношенні золотистого стафілококу та відповідно 15,6 - 125,0 мкг/мл до кишкової палички [15]. Флуоресцюючі та легко фіксуючі властивості акридинів запропоновано в якості відбірних тестів речовин зі спрямованою активною активністю [16]. Виявлена антибактеріальна та протигрибкова активність також є підставою для поглибленого дослідження атимікробної дії щодо розширеного спектру музейних і клінічних штамів ентеробактерій, гноєродних коків, грампозитивних паличок, неспоривих анаеробів, збудників поверхневих та глибоких мікозів тощо [17-19].

Оскільки загальна цитотоксична дія речовини може маніфестуватися широтою спектру проявленого антимікробного ефекту, то і на цьому етапі виявляється доцільним паралельне підключення фармакологічних тестів на токсичність.

Деякі методичні особливості існують при вивченні антифунгальної дії сполук. На відміну від бактерій патогенні гриби, перебуваючи в тих чи інших морфологічних формах (міцелій і його видозміни, різні типи спор в культуральній і тканевій формах), мають різну чутливість до хімічних речовин. У зв'язку з цим варто рахувати за доцільне одночасне вивчення активності речовин протигрибкової направленості по відношенню до грибів, що знаходяться в різних фазах і стадіях розвитку. Крім того, для стандартизації грибкових культур, за звичай, до цього часу використовують (за відсутності інших) бактеріальні стандарти мутності, що є не зовсім коректним. Адже суспензії клітин дріжджових і дріжджеподібних грибів доводять за вказаними стандартами ДКІ ім.Л.О.Тарасевича до густини 50 млн. м.т., враховуючи, що дійсна їх кількість при цьому буде в 40 - 50 разів меншою. Що стосується приготування зависей з міцеліальних грибів (дерматофітів, плісневих, філорфор), то підрахунки кількості клітинних елементів проводять, знову ж і на сьогодні, в камерах Горяєва, причом густина зависей із мучнистих культур повинна відповідати 500 - 600 млн клітинних елементів/мл ізотонічного розчину, а з культур шкірястого пухнастого типу - 2-3 млрд клітинних елементів/мл. Оскільки доведено, ш кількість елементів, здатних до проростання і розвитку, у шкірястих пухнастих культур у сотні разів менша, ніж у культур, багатих на спори, то в цих випадках необхідна корекція. Слід також відзначити, що тривале зберігання патогенних бактерій і грибів в культурі призводить до прояву плеоморфізму та їх некультура-

бельності (наприклад, «стерильний міцелій»), що співпадає зі зміною чутливості до хімічних сполук і неминуче позначається на результатах протигрибкового скринінгу. Нівелювання вказаних методичних недоліків проводиться шляхом періодичних пасажів збудників через організм сприйнятливих лабораторних тварин з поверненням природної патогенності, а також при культивуванні на спеціальних середовищах з екстрактами з органів тварин, середовищах з волоссям і лускою шкіри, та воно лише орієнтовне для дослідників [20].

Вельми важливим в плані антимікробного скринінгового відбору нових активних синтетичних сполук постає той факт, що за відсутності виражених протимікробних властивостей вони можуть бути перспективними з інших сторін - мікродобавки до існуючих хіміопрепаратів, що підвищують мікробну чутливість до них, засоби передпосівної обробки матеріалу, антиадгезини тощо [21].

Таким чином, раціональним для мікробіологічного скринінгу є відбір нових хімічних сполук з антимікробною активністю по широкому або вузькому спектрах, з низькою токсичністю, з притаманними їм дозозалежними іншими цінними властивостями (антиадгезія, протилізоцимна і протиімуноглобулінова дія тощо). Вельми перспективно впровадження підступів математичного моделювання зв'язків «хімічна структура - біологічна активність - токсичність». Таким чином, є нагальна необхідність удосконалення методів і засобів мікробіологічного, фармакологічного та токсикологічного скринінгу нових хімічних сполук, на основі яких в подальшому конструюються більш ефективні антибіотики, антисептики, дезінфектанти, про- і пребіотики.

Список літератури

1. Баренбойм Г.М., Маленков В.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. -М.: Наука, 1986. -363 с. 2. Васина Т.А. Комбинированная антибиотикотерапия - один из путей повышения эффективности антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. - 1998. - Т.43. -№5. -С. 42-43. 3. Галимов Э.М. Феномен жизни: между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции. -М.: Единориал УРСС, 2001. -256с. 4. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. -М.: Медицина, 1974. -144 с. 5. Грачев Н.М., Шетинина И.Н. Клиническая химиотерапия инфекционных болезней. -Л.: Медицина, 1985.-272 с. 6. Дудник Ю.В. Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий // Антибиотики и химиотерапия. - 1999. - Т.44.- №12.- С. 15-18. 7. Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Антимикробные агенты в будущем. Вклад геномики в их создание // Антибиотики и химиотерапия. - 1999. -Т.44.-№12.-С. 5-13. 8. Климов О.И. Системный подход к созданию новых лекарственных противомикробных средств // Анали Мечниковского института. -№ 1. - С.45-50. 9. Ковальчук В.П. Протимікробна активність і лікувально-профілактична дія антисептичних засобів та антимікробних матеріалів. Автореф. дис....д-рам.н.: 03.00.07. -Харків, 1999. -33 с. 10. Компьютерное моделирование в поиске противомикробных средств: принципы, подходы, методы/Волянский Ю.Л., Лисняк Ю.В., Кучма И.Ю., Клищенко О.А. и др. -Харьков: Основа, 1994. -208 с. 11. Кордун В.А. Эволюция и биосфера. - Киев: Наук. Думка, 1982. -264с. 12. Красильников А.П., Адарченко А.А., Собещук О.П. Сопоставление показателей антибактериальной активности антибиотиков и антисептиков // Госпитальные инфекции и лекарственная устойчивость микроорганизмов. -М., 1992. -С.72-74. 13. Методология биологии: новые идеи (синергетика, семиотика, коэволюция) /Отв. Ред. О.Е. Баксанский. - М.: Эдиториал УРСС, 2001. -264с. 14. Н.Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. Фундаментальные основы создания новых эффективных антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. -1992. -Т.37. -№4. -С.5-11. 15. Розенлит А.Б., Голендер В.Е. Логико-комбинаторные методы в конструировании лекарств. - Рига: Зинатне, 1984. -352 с. 16. Сидоренко С.В. Происхождение, эволюция и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. -1999. -Т.44. -№12.-С. 19-22. 17. Шевелова Н.Е. Методологические аспекты микробиологического скрининга новых химических соединений // Экспериментальная клиническая медицина. -2000. -№1. -С. 48-50. 18. Шевелова Н.Е., Комиссаренко А.Н., Великая М.М. Влияние желчных кислот на специфическую активность антимикробных препаратов // Междун. сб. науч. тр. «Лекарства - человеку». -2001. - Том XVI. -№1-2. -С. 531-536. 19. Шевельова Н.Ю. Мікробіологічне обґрунтування розробки нових антимікробних засобів на основі медичної жовчі // Вісник Вінницького державного медичного університету. -200. -4.-1.- С.57-60. 20. Шендеров Б.А. Антимикробные эффекты лекарственных препаратов, не являющихся антибиотиками // Антибиотики и химиотерапия. = 1997. -Т.42. - №8. -С. 26-30. 21. Шендеров Б.А. Трансмиссивная лекарственная устойчивость бактерий. Дис...докт. мед. наук. - Саратов, 1975. -374 с.

METHODOLOGICAL AND METHODICAL ASPECTS OF SYNTHESIS AND SCREENING OF ANTIMICROBIAL CHEMICAL SUBSTANCES

Shatilo Yu.V., Volyansky A.Yu., Voropay A.Yu., Val'chuk S.I., Rudenko L.M., Volkova A.O., Mizin V.V., Volkov T.O., Kuchma I.Yu.

«Institute of microbiology and immunology named after I.I. Mechnikov AMS of Ukraine»

The contemporary methodological and methodical ways to synthesis, microbiological, pharmacological and toxicological screening of chemical substances have been determined. It makes possible the creation of new effective and non-toxic antimicrobial drugs.