

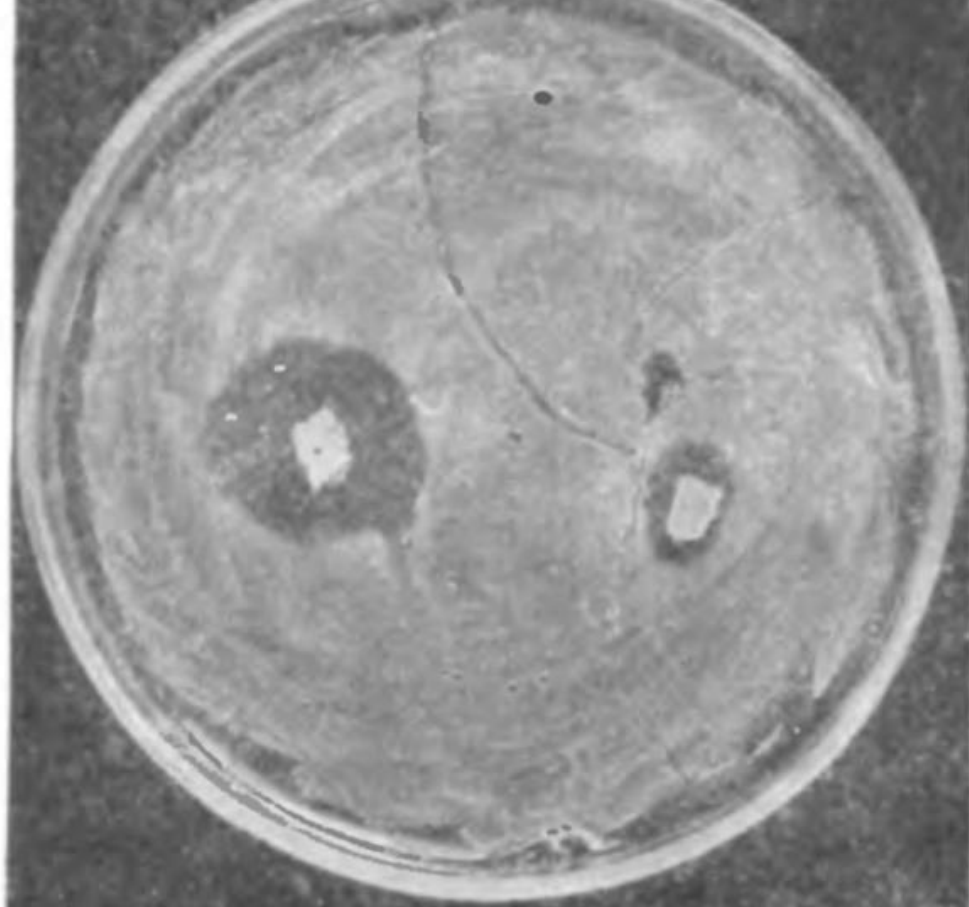
Межфакультетский учебный курс
«Микроорганизмы, ферменты и медицина. Новые возможности»

β-ЛАКТАМНЫЕ АНТИБИОТИКИ И β-ЛАКТАМАЗЫ – «МЕЧ» МЕДИЦИНЫ И «ЩИТ» ПАТОГЕНОВ

Еремеев Николай Леонидович
доктор химических наук, профессор

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии*

nleremeev@gmail.com





Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* // British Journal of Experimental Pathology. – 1929. – V. 10. – P. 226-236



Alexander
Fleming

Howard
Florey

Ernst
Chain

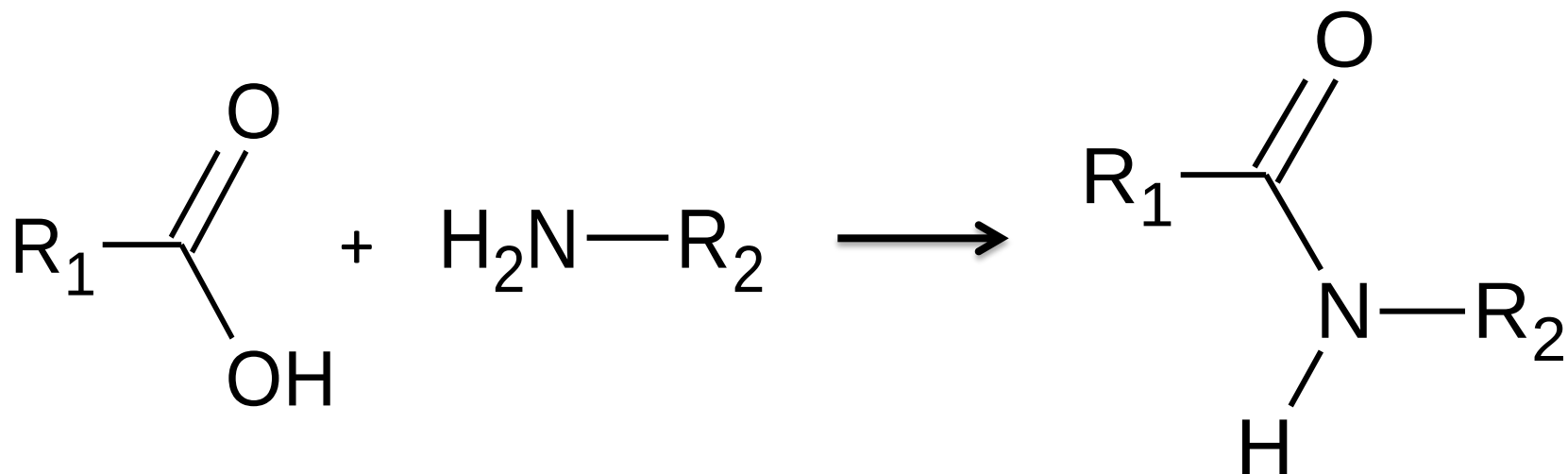
Нобелевская премия по физиологии и медицине 1945 г.
«...за открытие пенициллина и его целебного воздействия
при различных инфекционных болезнях.»

1941 г. – пенициллины (бензилпенициллин)

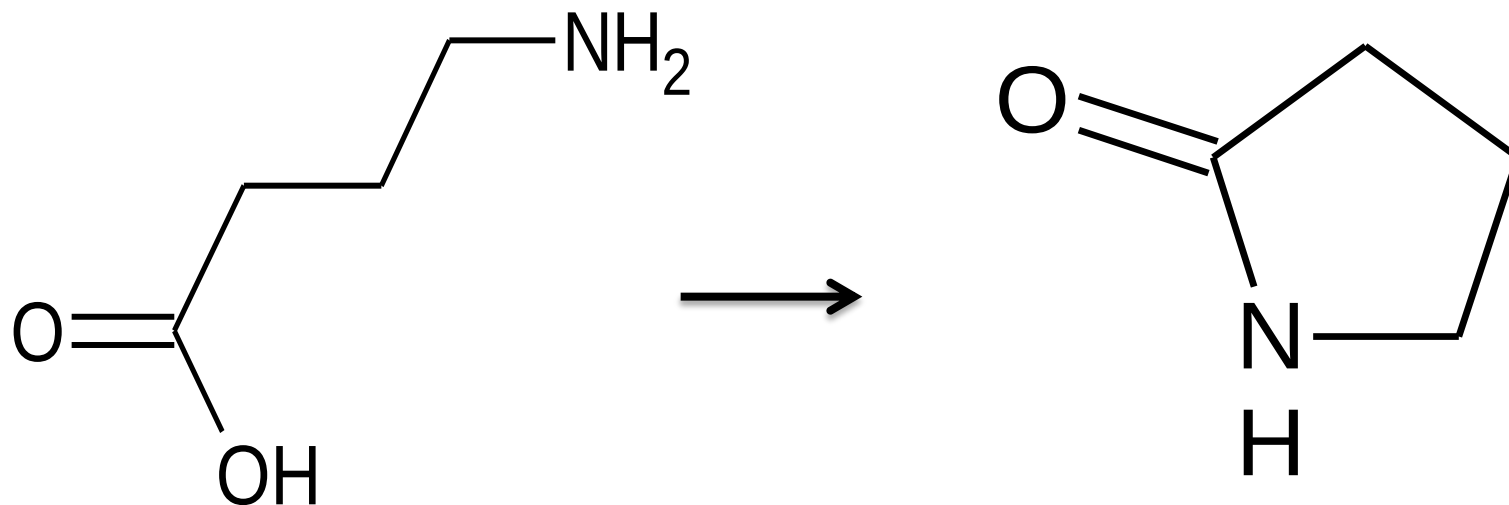
1948 г. – цефалоспорины

Середина 1980-х гг. – карбапенемы и монобактамы

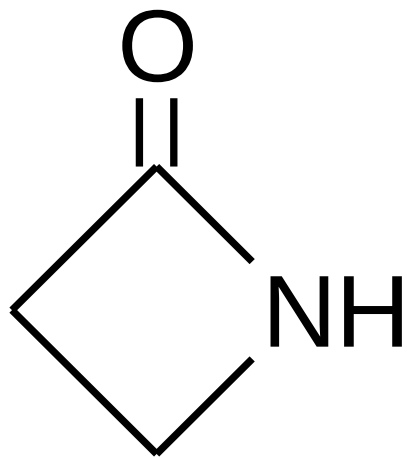
Около 2/3 всех назначений антибиотиков приходится на β -лактамы
(данные проекта ARPAC –Antibiotic Resistance Prevention and Control)



Образование пептидной связи



Образование лактамной структуры

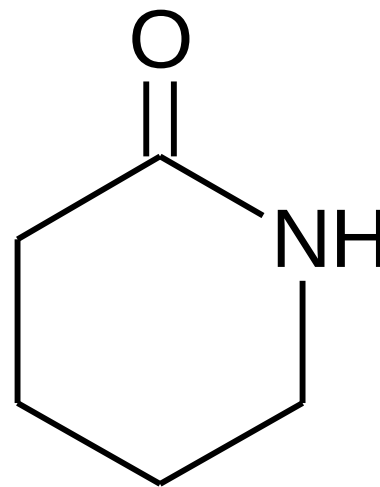


β -лактам

β -пропиолактам

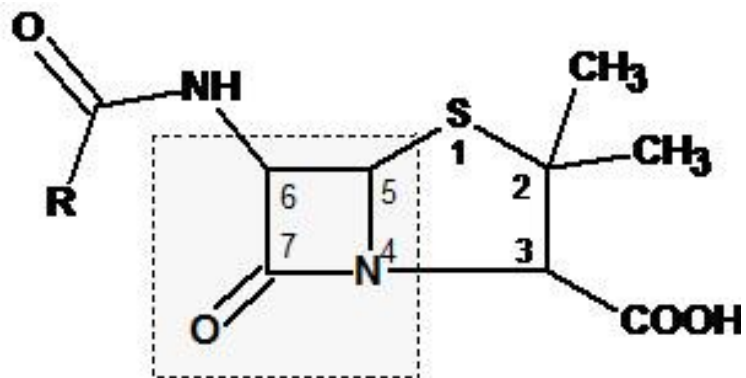
2-азетидион

азетидин-2-он

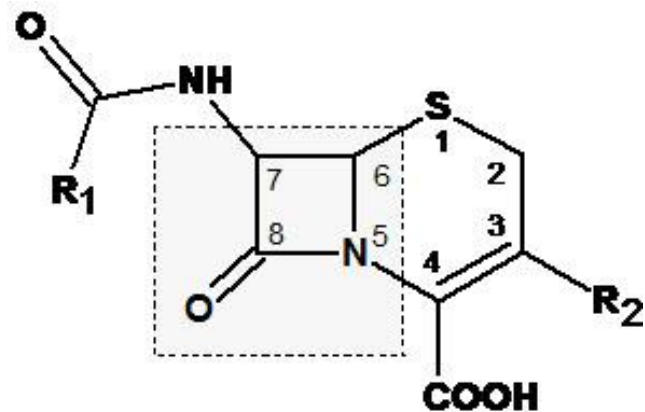


δ -лактам

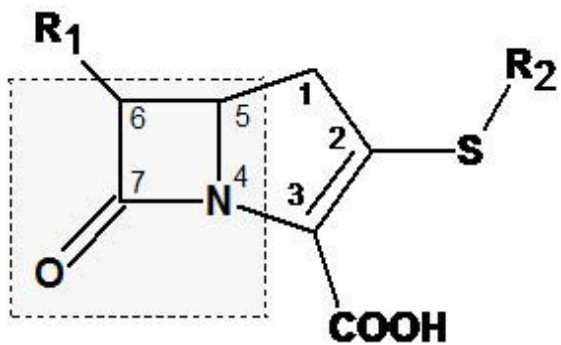
капролактам



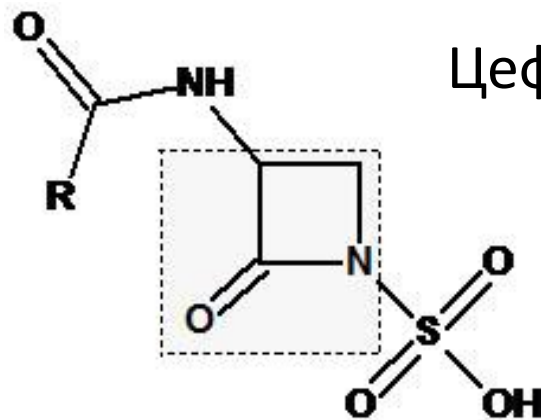
Пенициллины



Цефалоспорины

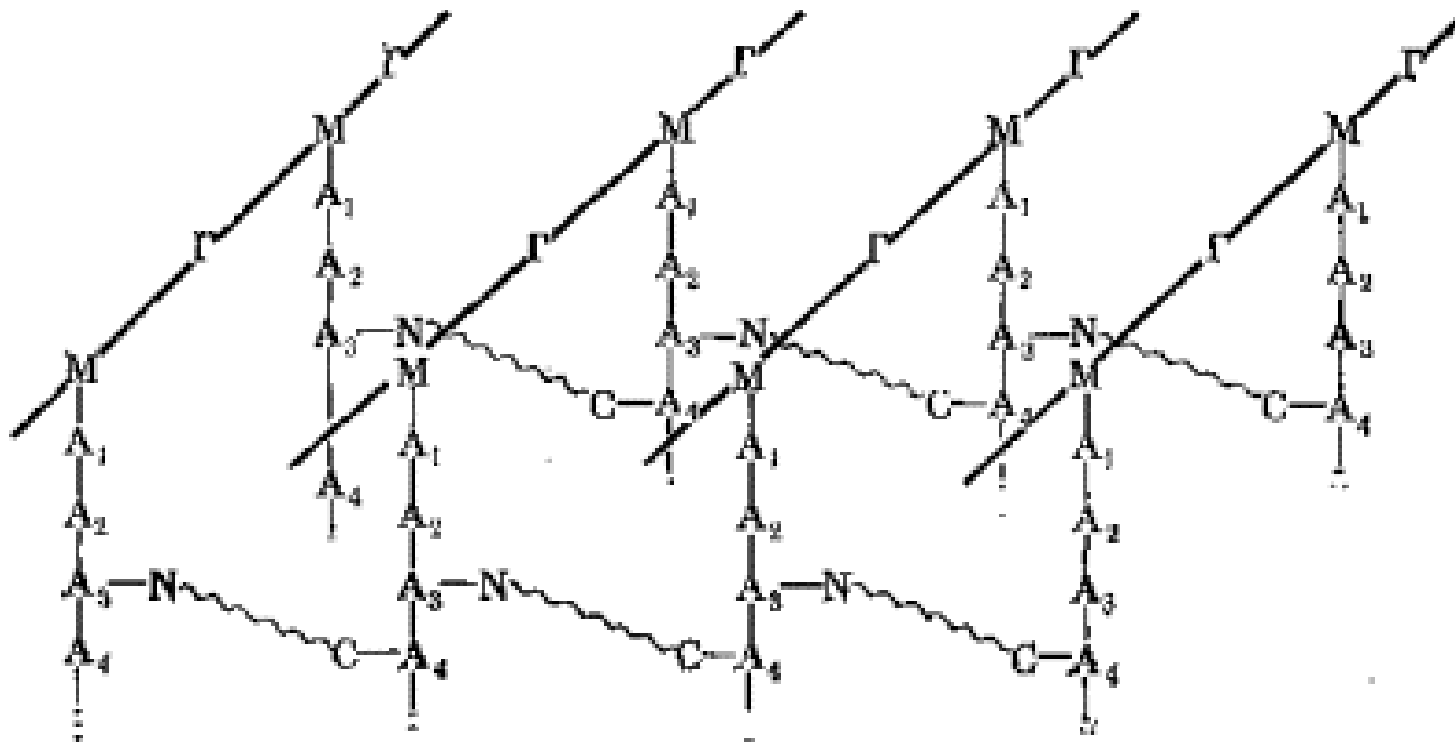


Карбапенемы

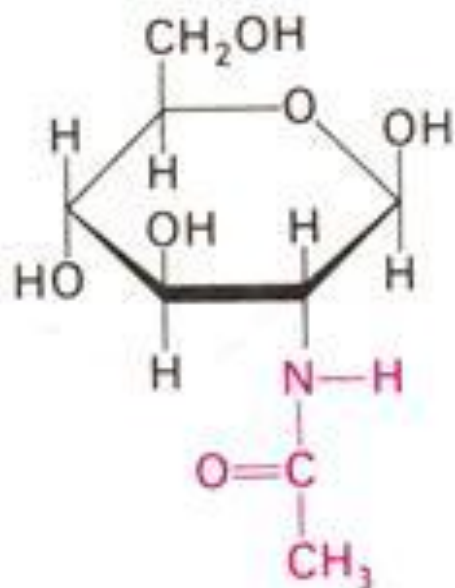


Монобактамы

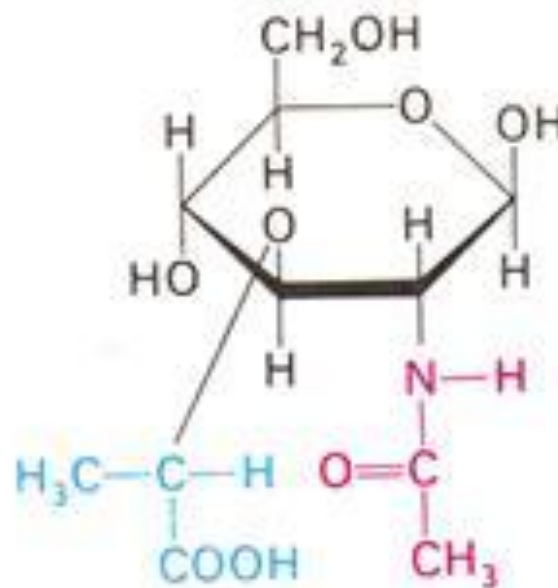
Схематичное изображение пептидогликана



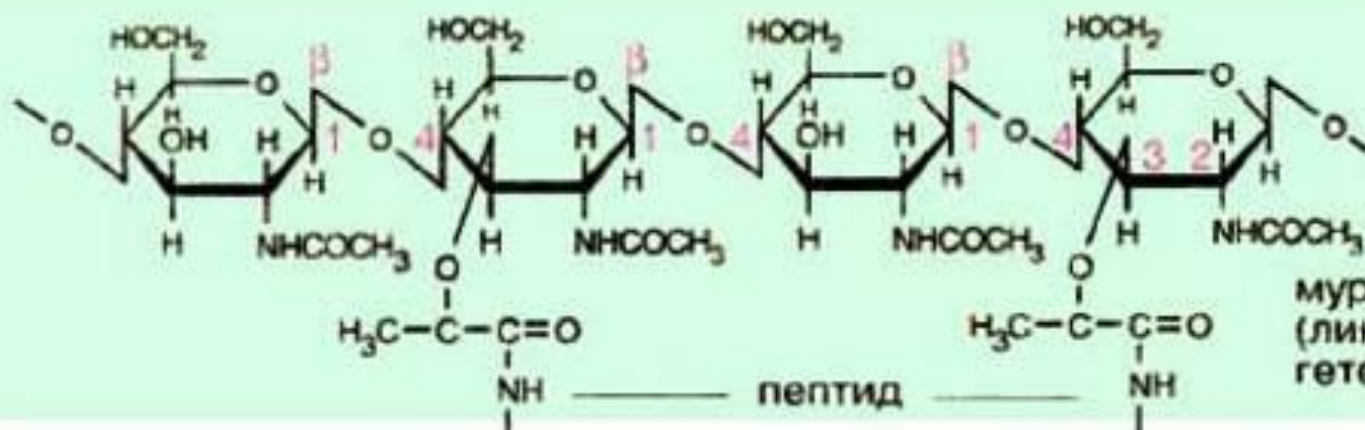
Полисахаридная основа пептидогликана



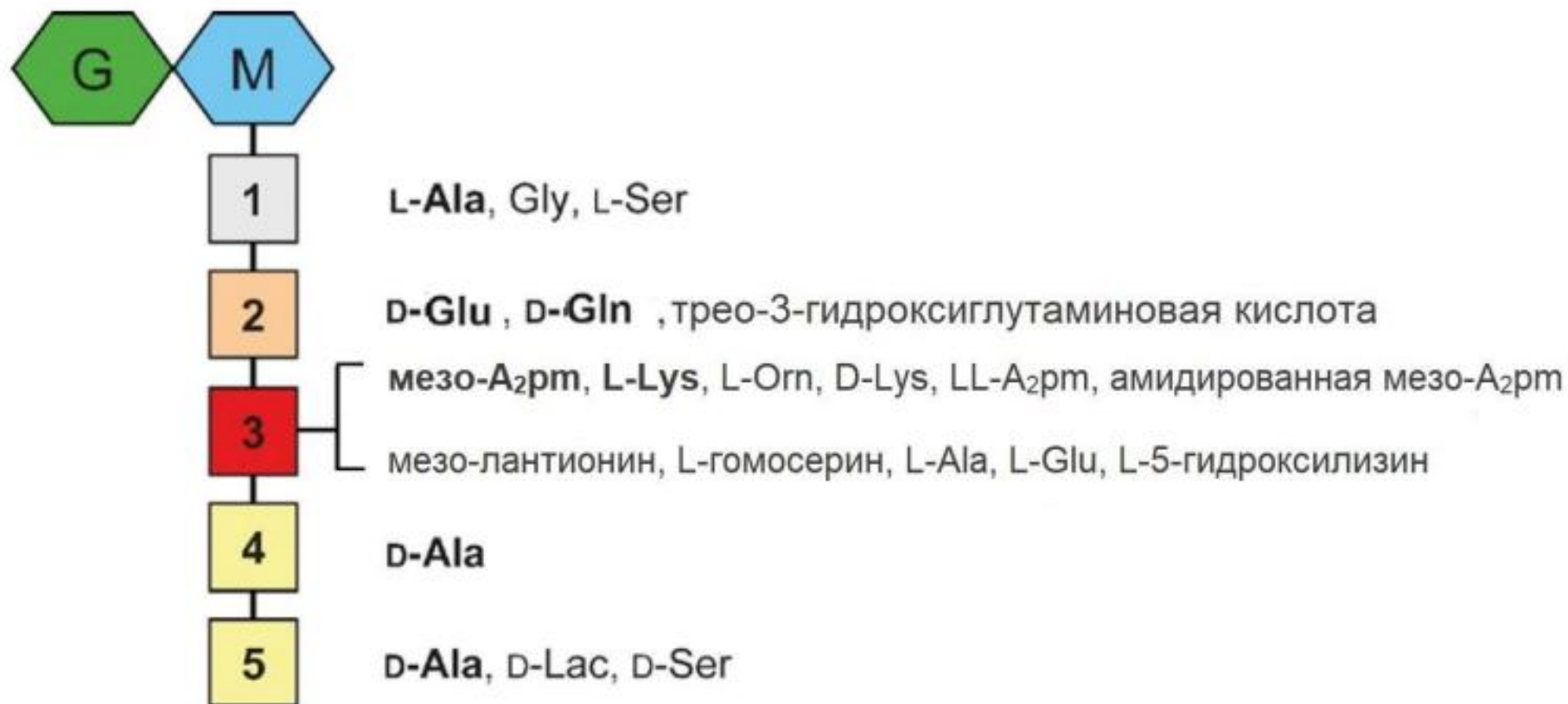
N-ацетилглюкозамин
(NAG)



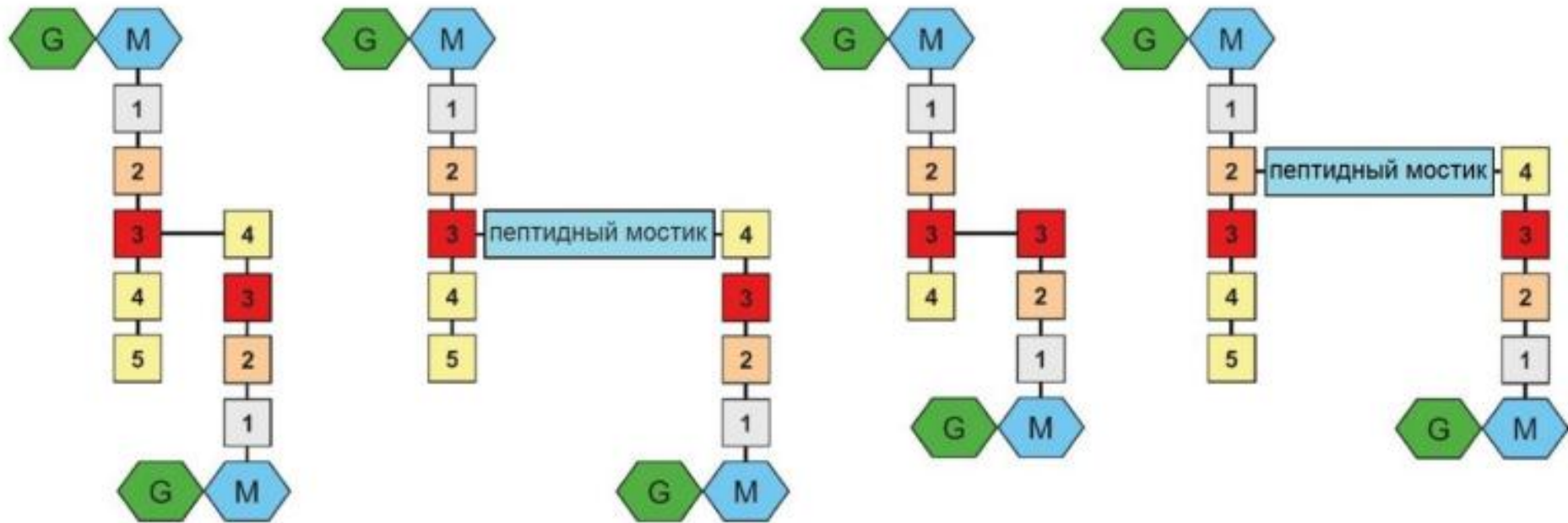
N-ацетилмурамовая кислота
(NAM)



Аминокислотный состав пентапептидов пептидогликана



Виды пептидных связей между цепями полисахаридов



P. Schumann. Peptidoglycan structure. – Meth.Microbiol., 2011, v.38, p.101-129.

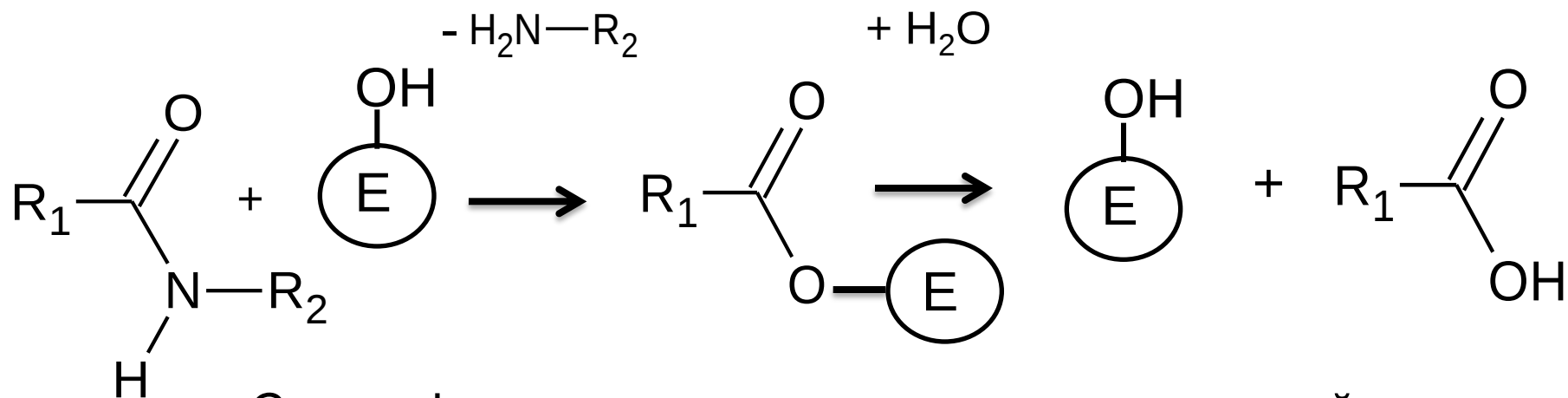


Схема ферментативного гидролиза пептидной связи

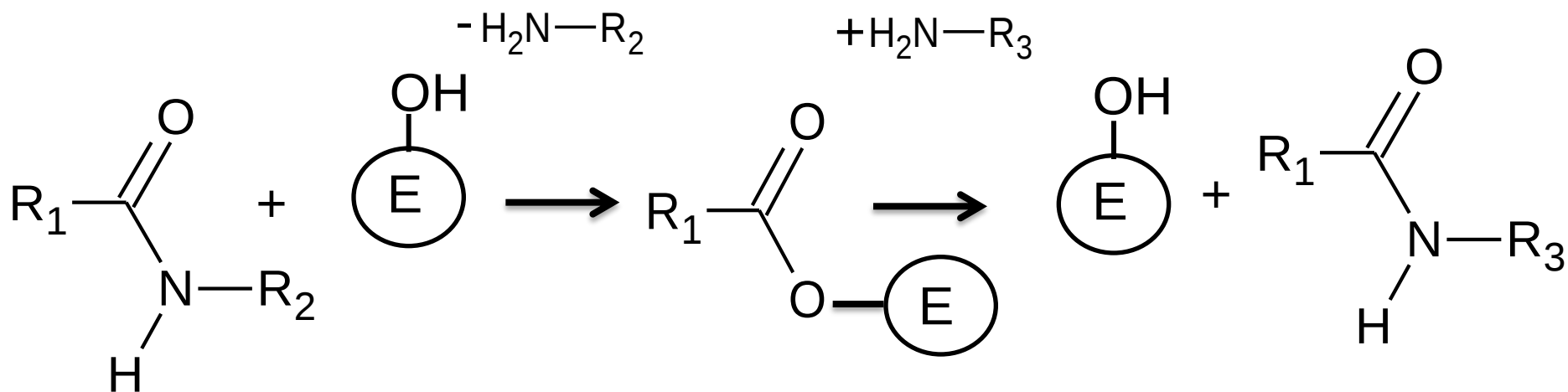
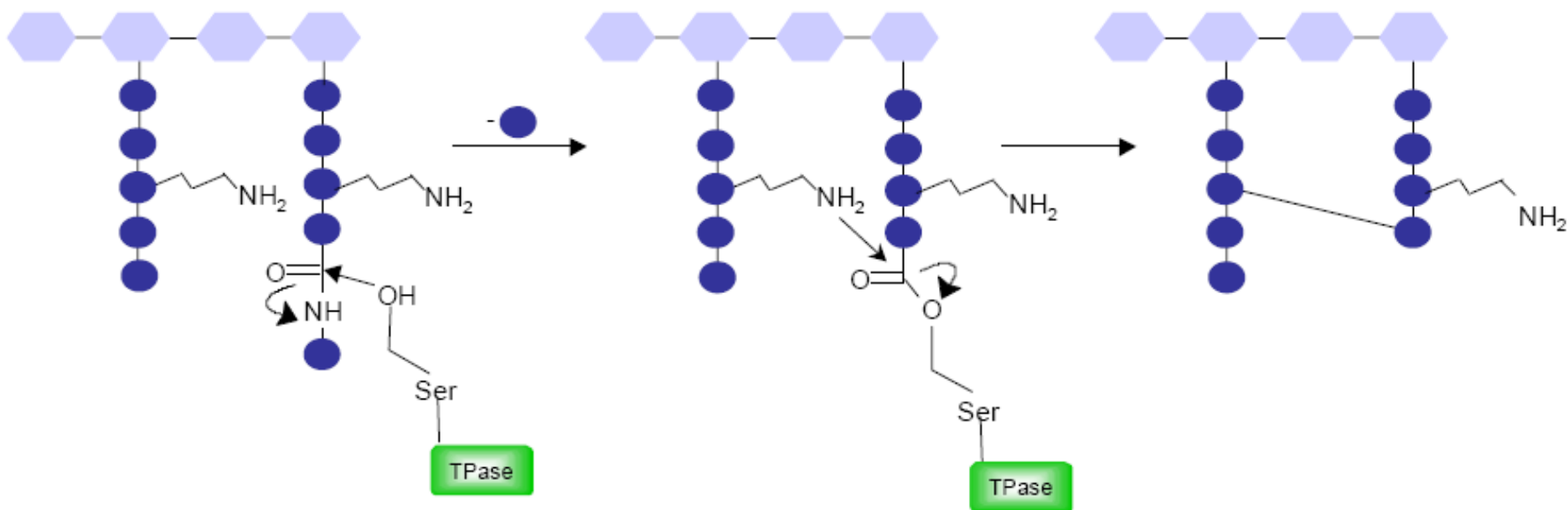
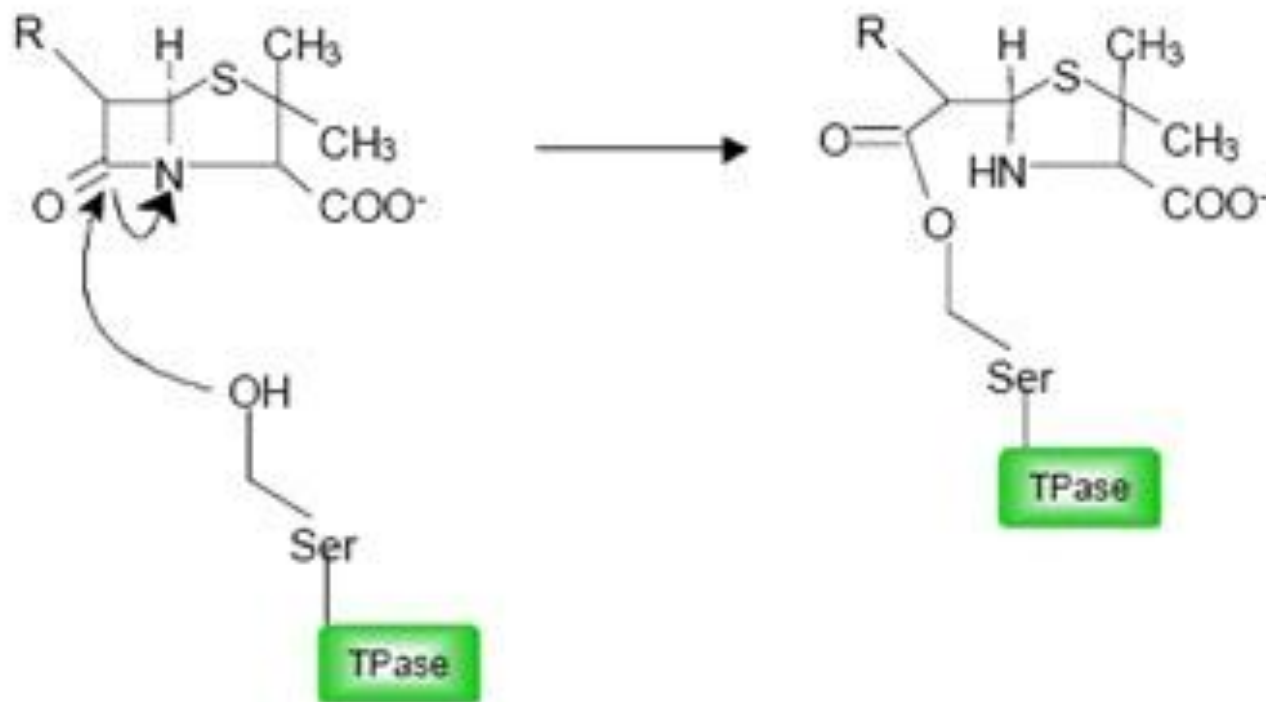


Схема ферментативного трансаминирования



Механизм синтеза пептидогликана под действием транспептидаз (TPase)



Механизм необратимой инактивации транспептидаз β -лактамными антибиотиками. Образующийся ацилфермент не подвергается гидролизу.

Бета-лактамы, антибиотик



Механизм гидролиза β -лактамных антибиотиков сериновыми β -лактамазами

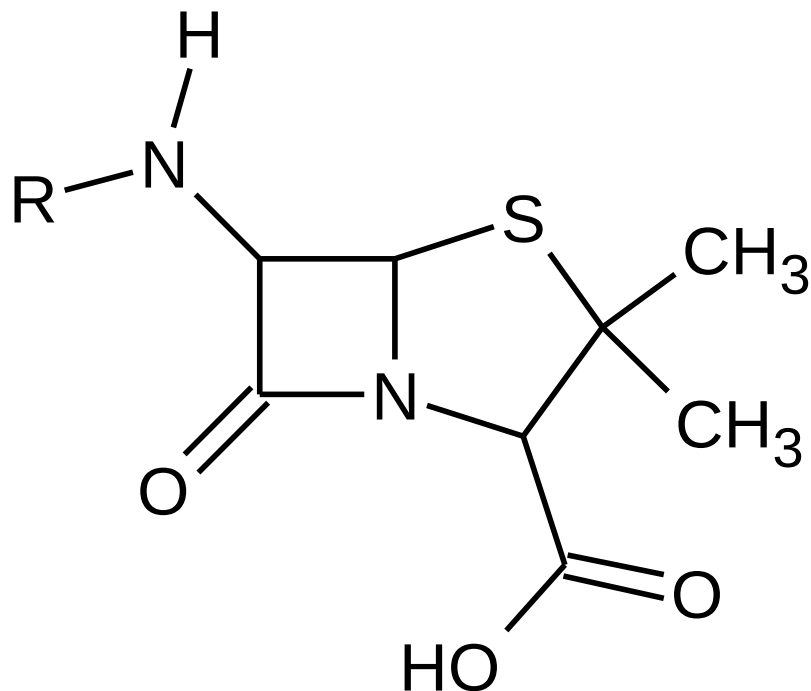
ЕС 3.5.2.6 – пенициллиназа

ЕС 3.5.2.8 - цефалоспориноаза

Классификация β -лактамаз (всего 4 класса, 16 групп, более 2000 ферментов,
<http://www.lahey.org/Studies/template.asp/>)

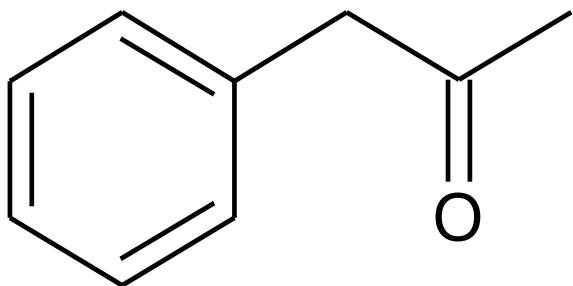
Группа	Молекулярный класс	Микроорганизмы – «хозяева»	Локализация гена	Предпочтительные субстраты	Основные представители
1	C	Грамотрицательные бактерии (в основном, семейство <i>Enterobacteriaceae</i>)	хромосомы, редко плазмиды	цефалоспорины I—III поколений; в меньшей степени пенициллины	AmpC, ACT-1 CMY-2
1e	C	<i>E. cloacae</i> <i>P. aeruginosa</i>	хромосомы, редко плазмиды	цефалоспорины I—III поколений, преимущественно цефтазидим	GC1 CMY-37
2a	A	Грамположительные бактерии <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Bacillus</i> spp.	плазмиды	природные и полусинтетические пенициллины	PC1
2b	A	Грамотрицательные бактерии (в основном, семейство <i>Enterobacteriaceae</i>)	плазмиды, редко хромосомы	пенициллины, включая ампициллин, амоксициллин, тикарциллин, цефалоспорины I поколения и цефоперазон	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Грамотрицательные бактерии (в основном, семейство <i>Enterobacteriaceae</i>)	плазмиды, редко хромосомы	цефалоспорины III–IV поколений и монобактамы наряду с ранними цефалоспоринами и пенициллинами	TEM-3 SHV-2 CTX-M-15

Пенициллины

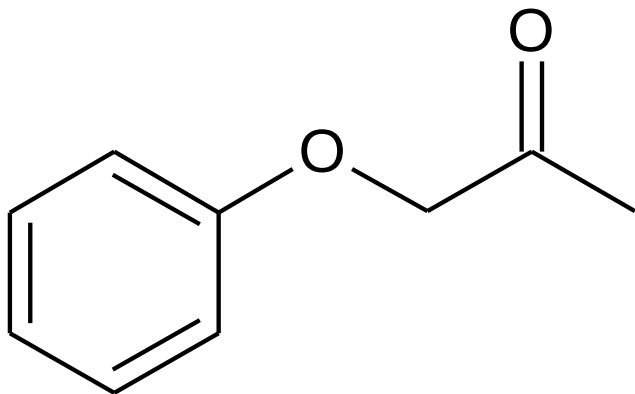


Структура 6-аминопенициллановой кислоты (R = H)

Природные пенициллины



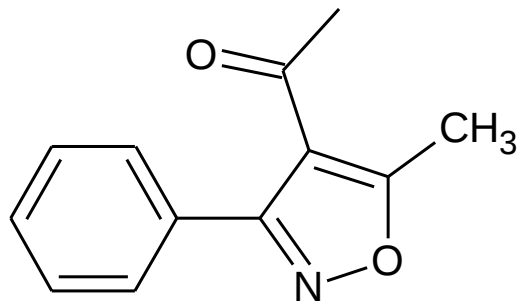
Бензилпенициллин
(пенициллин G)



Феноксиметилпенициллин
(пенициллин V)

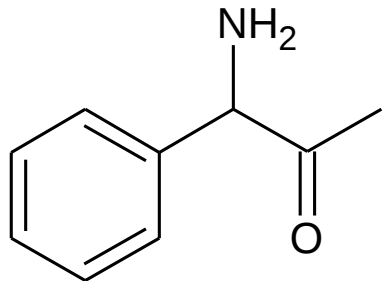
Изоксазолпенициллины (оксациллин, клоксациллин, флуклоксациллин, метициллин, нафциллин, диклоксациллин).

Узко выраженная антистафилококковая активность. В отношении других бактерий активности не проявляют



оксациллин

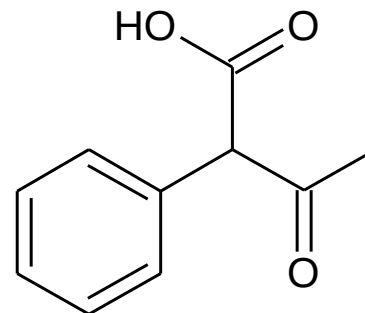
Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин, талампициллин, бакампициллин, пивампициллин). Превосходят природный антибиотик по активности и кислотостойкости. Не влияют на синегнойную палочку (*P.aeruginosa*).



ампициллин

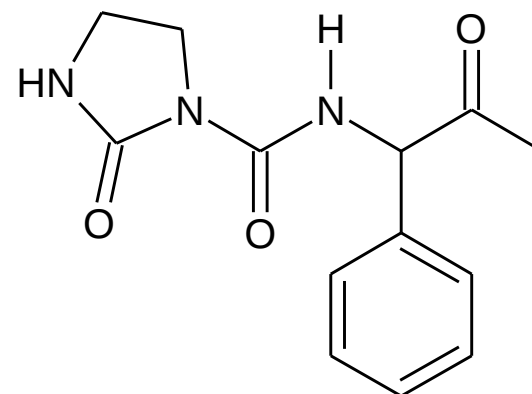
Карбоксипенициллины

(карбенициллин, трикарциллин, карфециллин, кариндациллин)



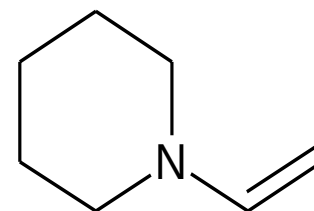
карбенициллин

и **уреидопенициллины** (азлоциллин, мезлоциллим, пиперациллин) относят к препаратам расширенного спектра действия, а том числе активным против синегнойной палочки.



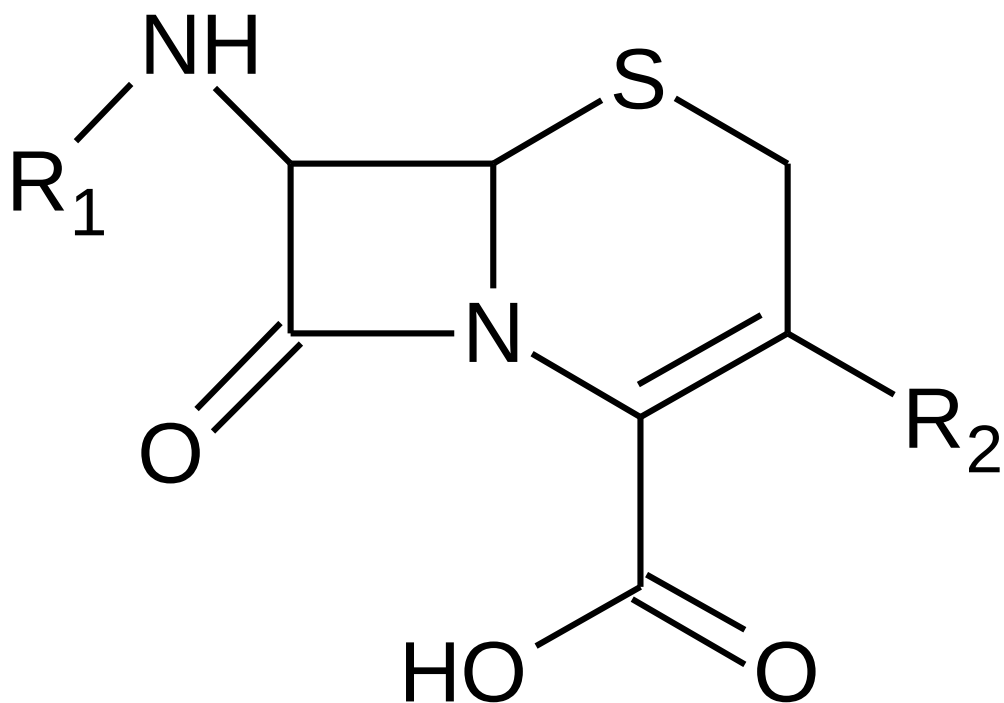
азлоциллин

Амидинопенициллины (амдиноциллин, пивамдиноциллин, бакамдиноциллин, ацидоциллин). Узкая активность по отношению к грам-отрицательным бактериям.



пивамидиноциллин

Цефалоспорины



Структура 7-аминоцефалоспорановой кислоты ($R_1, R_2 = H$)

Цефалоспорины **первого поколения** (цефалотин, цефалоридин, цефалексин, цефалоглицин, цефазолин, цефаприн и др.).

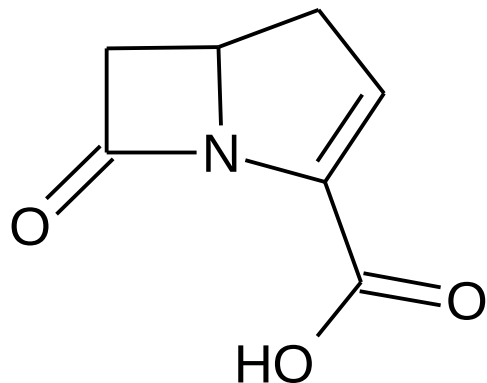
Демонстрируют высокую антибактериальную активность по отношению к *E.coli* и *Klebsiella pneumonia*. Неактивны против *Pseudomonas*.

Цефалоспорины **второго поколения** (цефуроксим, цефокситин, цефаклор, цефадроксил, цефамандол и др.). Более активны по отношению к грам-отрицательным бактериям, включая *Proteus spp.* и *Enterobacter spp.*

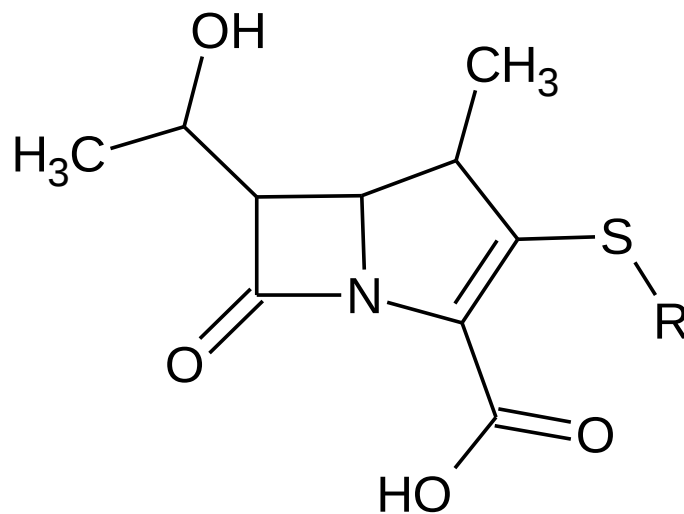
Цефалоспорины **третьего поколения** (иминоцефалоспорины – цефотаксим, цефтазидим, цефоперазон, цефтизоксим, цесулодин, цефтриаксон и др.). Повышенная антибактериальную активность по отношению к широкому кругу микробов.

Цефалоспорины **четвертого** (цефипим, цефипром) и **пятого** (цефтобипрол, цефтароин, цефтолозан) **поколений** - введение в С(3) положение иминоцефалоспоринов гетероциклических заместителей с четвертичным аммонийным азотом, что привело к еще большему увеличению биологической активности соединений, особенно в отношении грам-отрицательных бактерий.

Карбапенемы



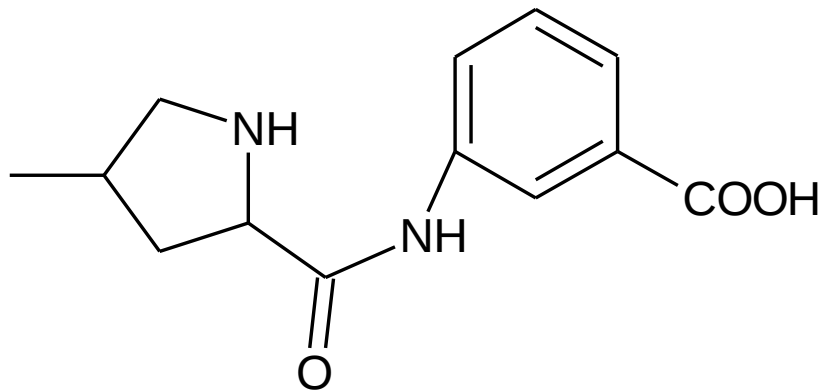
карбапенем



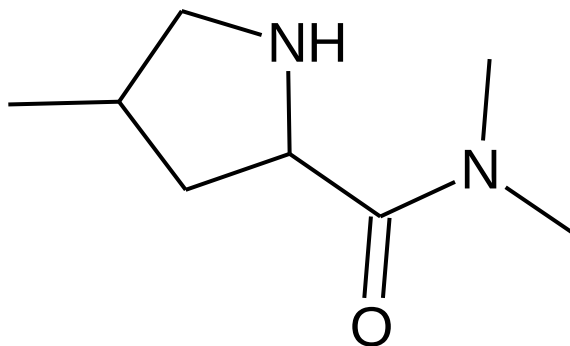
Структурное ядро антибактериально
активных производных карбапенема



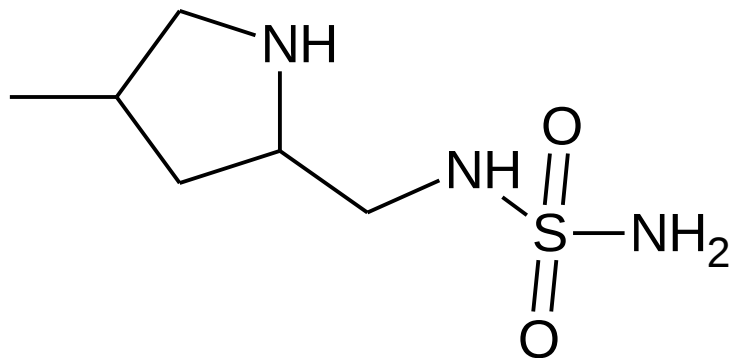
Имипенем



Эртапенем

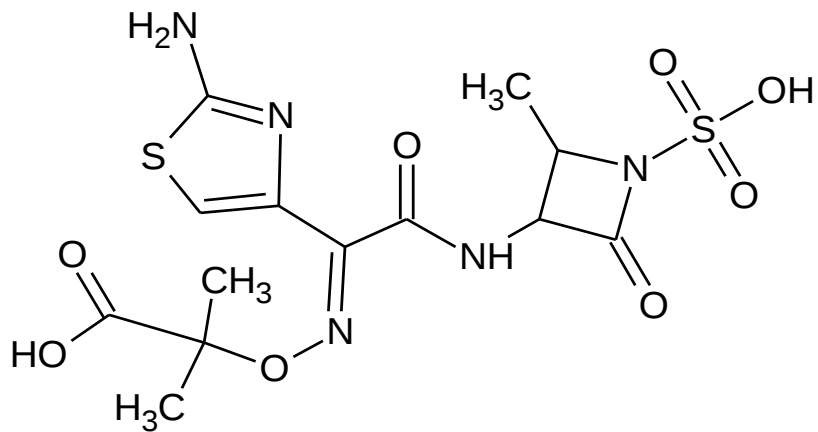


Меропенем



Дорипенем

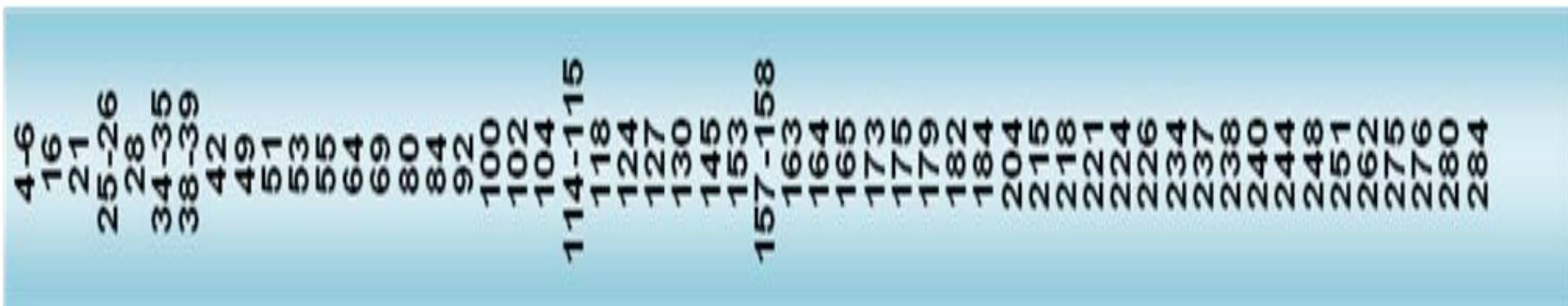
Монобактамы



азтреонам

β -Лактамазы расширенного спектра – БЛРС

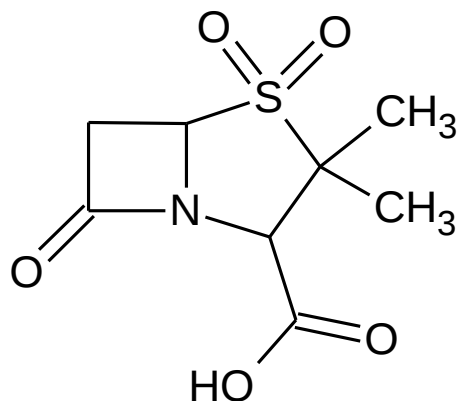
Класс А, подгруппа 2be, TEM-тип. TEM-1 – 288 ао



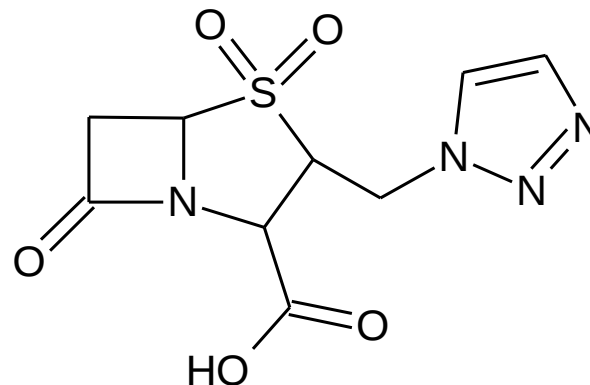
Положения мутаций у β -лактамаз TEM-типа (более 200 вариантов, от 1 до 7 единичных замен, нумерация аминокислот по аминокислотной последовательности TEM-1 β -лактамазы). За БЛРС отвечают мутации в положениях 104, 164, 238, 240.

V.Grigorenko, M.Rubtsova, I.Andreeva, D.Shcherbinin, A.Veselovsky, O.Serova, M.Ulyashova, I.Ishtubaev, A.Egorov. Mutual influence of secondary and key drug-resistance mutations on catalytic properties and thermal stability of TEM-type β -lactamases. – FEBS Open Bio, 2018, v.8, p.117-129.

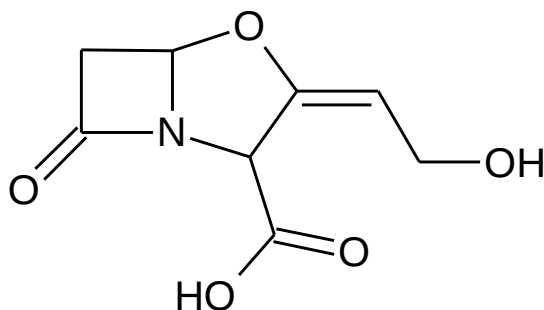
Необратимые инактиваторы β -лактамаз



сульбактам



тазобактам



клавулановая кислота

Ингибиторозащищенные пенициллины - более половины назначений всех пенициллинов в европейских госпиталях

Ингибиторорезистентные (ИР) β -лактамазы

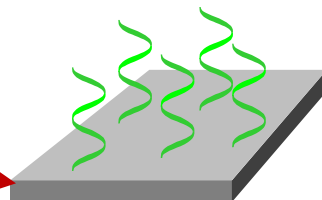
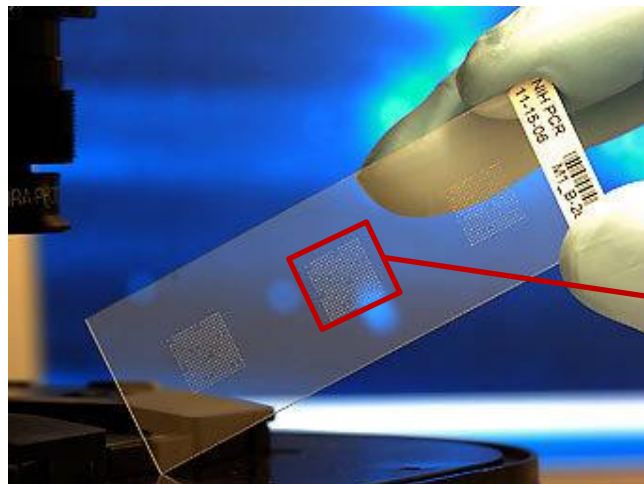
Класс А, подгруппа 2be, TEM-тип. TEM-1 – 288 ао



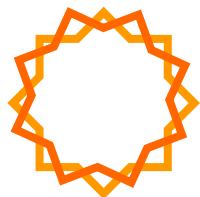
Положения мутаций у β -лактамаз TEM-типа (более 170 вариантов, от 1 до 7 единичных замен, нумерация аминокислот по аминокислотной последовательности TEM-1 β -лактамазы). За ИР отвечают мутации в положениях 69, 130, 244, 275, 276.

V.Grigorenko, M.Rubtsova, I.Andreeva, D.Shcherbinin, A.Veselovsky, O.Serova, M.Ulyashova, I.Ishtubaev, A.Egorov. Mutual influence of secondary and key drug-resistance mutations on catalytic properties and thermal stability of TEM-type β -lactamases. – FEBS Open Bio, 2018, v.8, p.117-129.

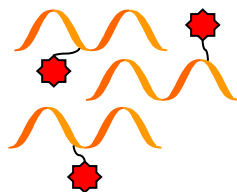
ДНК-микрочипы



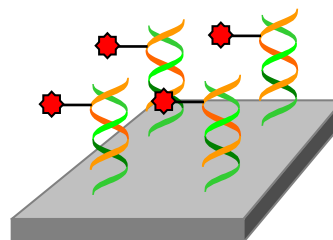
ДНК-микрочип
носитель с иммобилизованными
олигонуклеотидными зондами



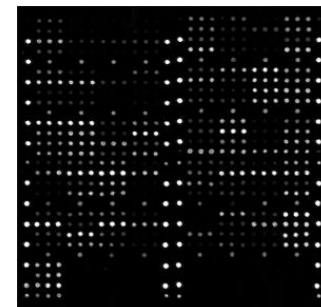
**Выделение
бактериальной
ДНК из образца**



**Аmplификация
гена с включением
метки**



**Гибридизация на
ДНК-микрочипе**



**Детекция
результатов
гибридизации**

Структурный элемент ДНК-микрочипа

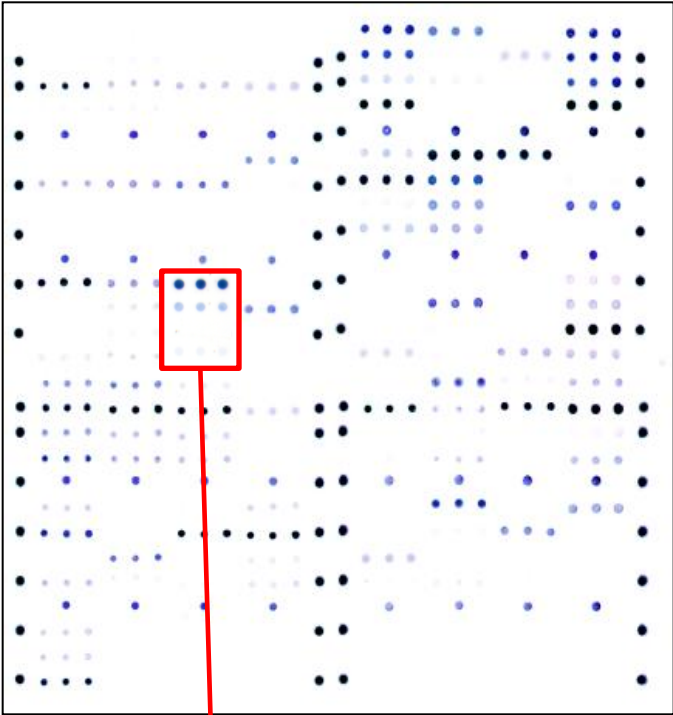
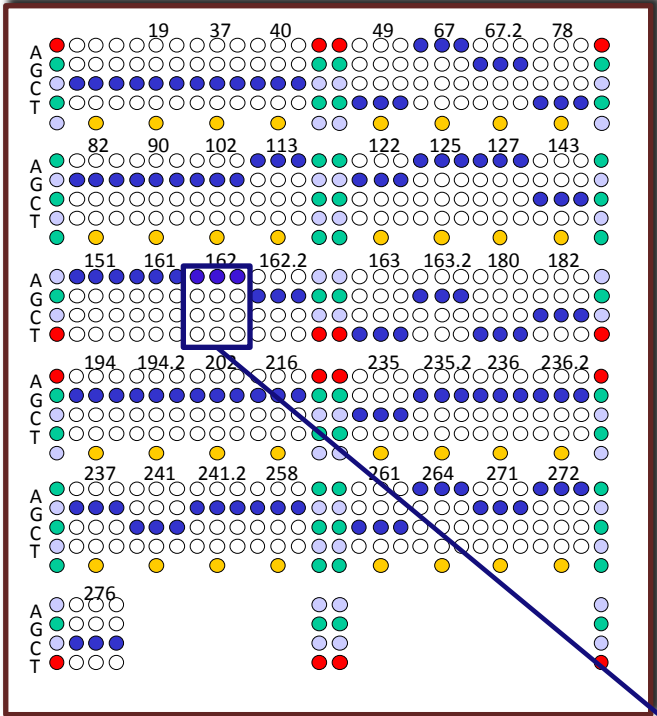
Олигонуклеотид,
меченный биотином

Иммобилизованный
олигонуклеотидный
зонд

Спейсер



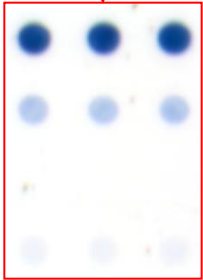
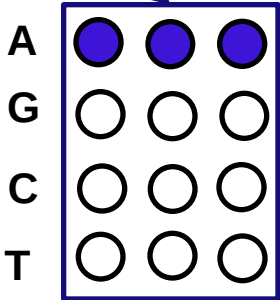
Определение ОНП генов TEM β-лактамаз на колориметрических ДНК-микрочипах



- Контроль иммобилизации
- Групп-специфический контроль для TEM
- Отрицательный контроль гибридизации
- Положительный контроль гибридизации

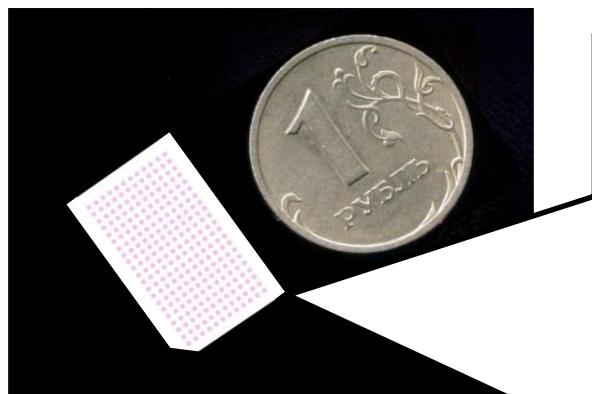
Набор олигонуклеотидных зондов

CGC CTT GAG AGT TGG GAA CCG
 CGC CTT GAG GGT TGG GAA CCG
 CGC CTT GAG CGT TGG GAA CCG
 CGC CTT GAG TGT TGG GAA CCG



- Perfect Match (PM)
- MisMatch (MM)
- MisMatch (MM)
- MisMatch (MM)

Микрочип содержит 74 олигонуклеотидных зондов для идентификации генов TEM, SHV и CTX-M β -лактамаз и 25 мутаций в них

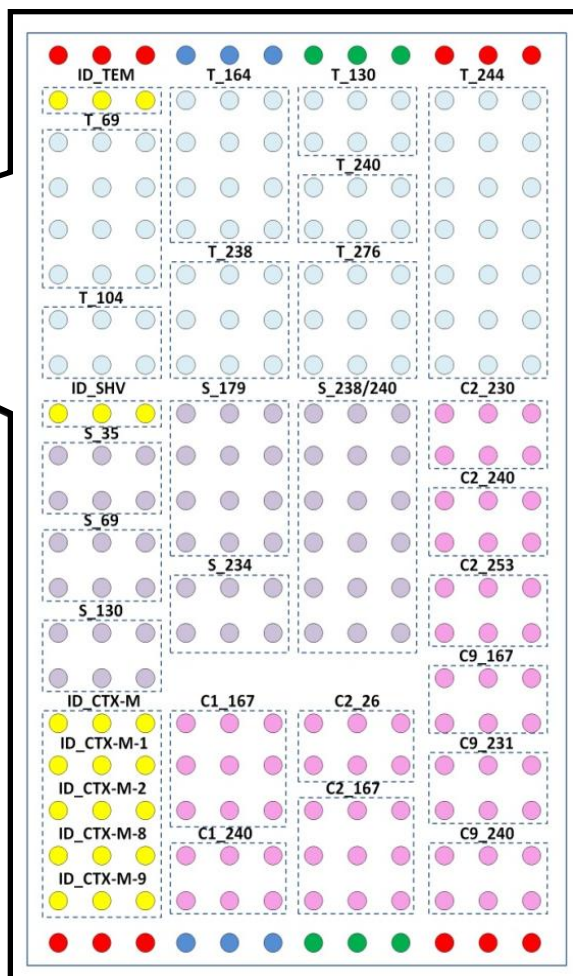


Подложка: **наylon**, 0,45 мкм

Размер чипа: **8 мм x 14 мм**

Диаметр точки: **~ 400 μ m**

Количество точек: **246**



Контроль иммобилизации

Положительный контроль гибридизации

Отрицательный контроль гибридизации

Зонды для идентификации типа β -лактамазы

Зонды для определения мутаций в blaTEM

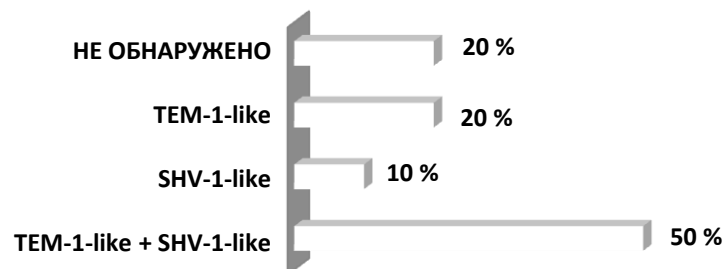
Зонды для определения мутаций в blaSHV

Зонды для определения мутаций в blaCTX-M

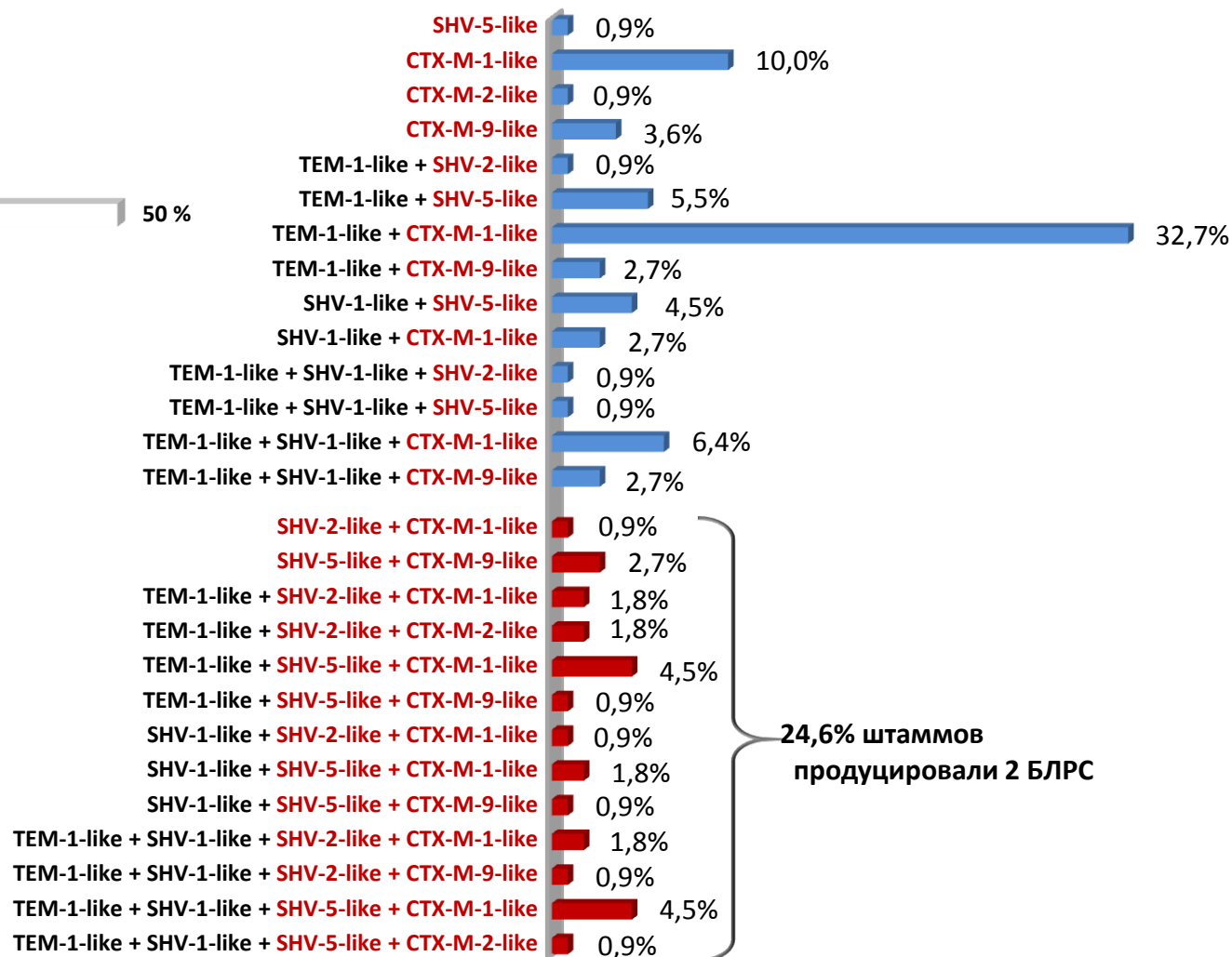
Апробация ДНК-микрочипа на клинических штаммах *Enterobacteriaceae* (n = 100)

(М.М.Уляшова – дисс.канд.хим.наук, Москва, 2011)

БЛРС– (n = 10):



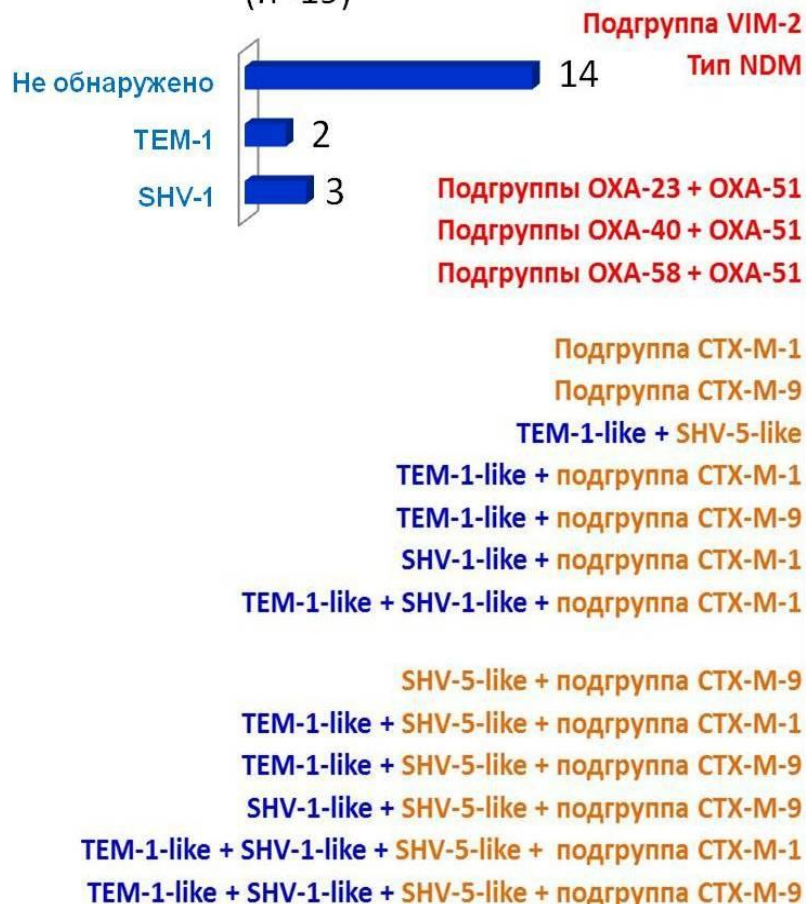
БЛРС+ (n = 90):



Апробация ДНК-микрочипа на клинических штаммах *P.aeruginosa*, *A.baumannii* и *Enterobacteriaceae* (n = 68)

(Ю.И.Поболелова – дисс.канд.хим.наук, Москва, 2017)

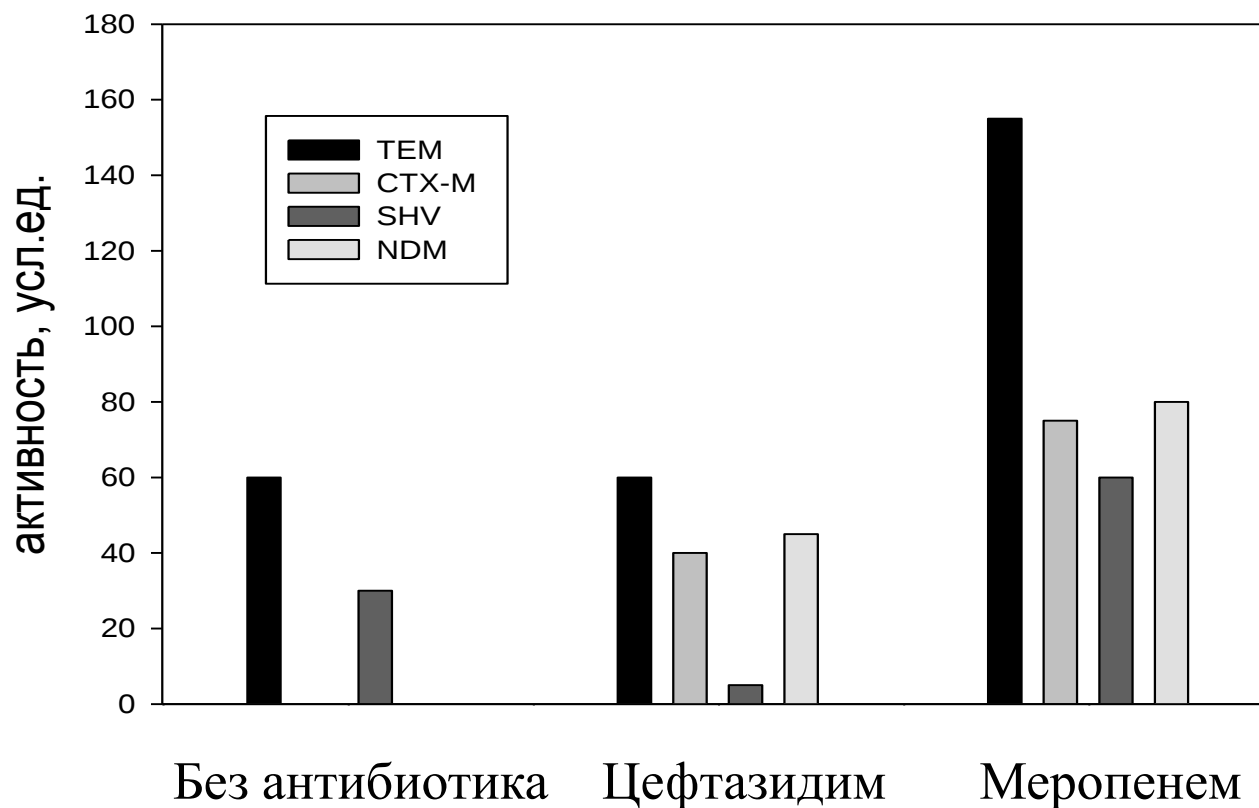
Чувствительные к карбапенемам
и цефалоспорином 3-4 поколения
(n=19)



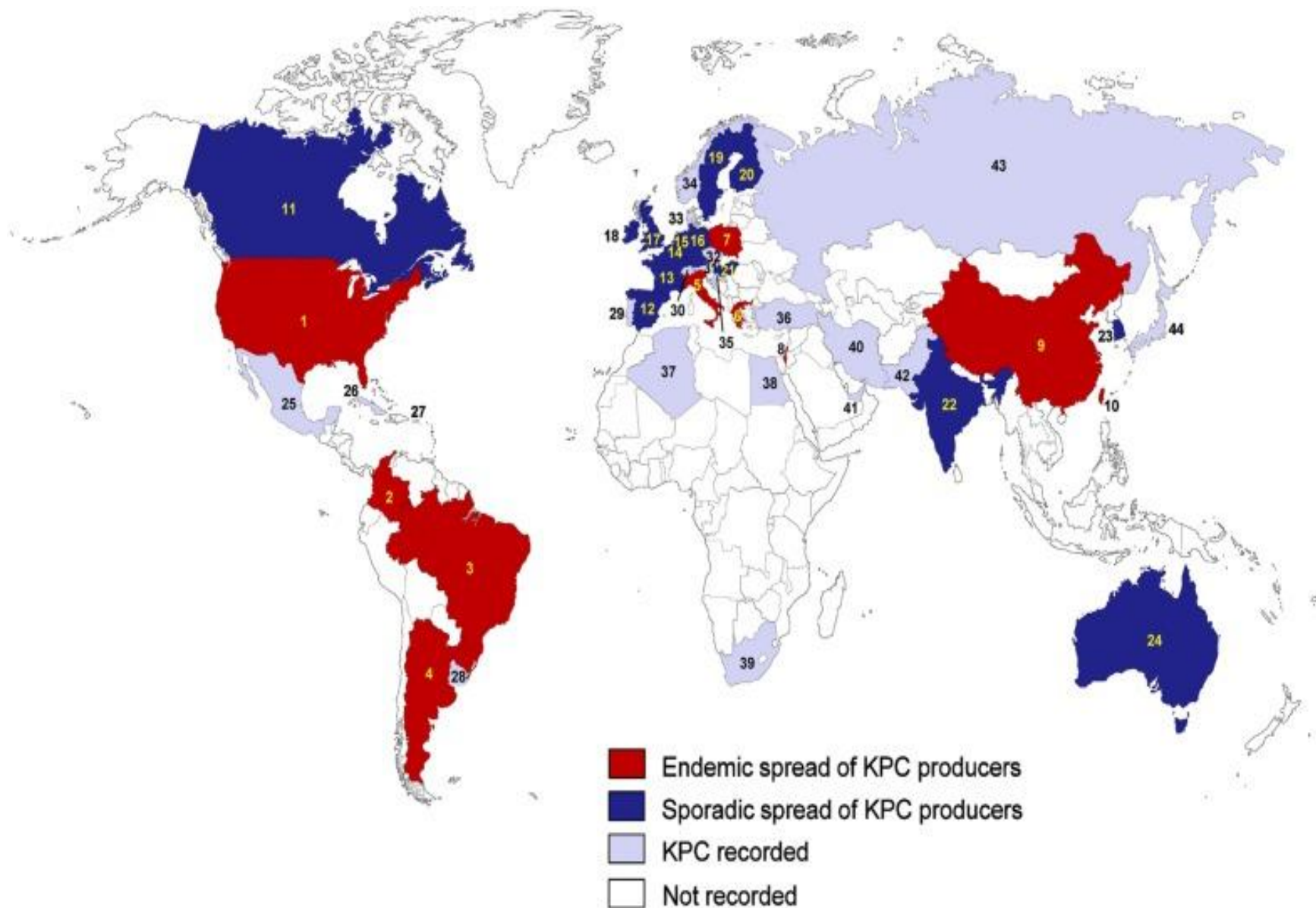
Устойчивые к карбапенемам (n=22)
или цефалоспорином 3-4 поколения (n=27)
(Σn=49)



Экспрессируемые гены β -лактамаз *K. pneumoniae* штамм1781 при выращивании на различных антибиотиках



Данные любезно предоставлены М.Ю.Рубцовой, Химический факультет МГУ



Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Kim Y.B., Jeong B.C., Lee S.H. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. - Front Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 895

Изучение β -лактамазного профиля штаммов *Enterobacteriaceae* домашних животных (собаки (n=315) и кошки (n=74)) показало, что более чем в 85% случаев состав БЛРС штаммов у животных совпадает с составом БЛРС штаммов их хозяев.

J.S.Hong, W.Song, H.-M.Park, J.-Y.Oh, S.Shin, S.H.Jeong. Clonal spread of extended-spectrum cephalosporine-resistant *Enterobacteriaceae* between companion animals and humans in South Korea. – Front. Microbiol., 2019, v.10: 1371.