

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ломоносовские чтения - 2015

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ:
ДИАГНОСТИКА, ФАРМАЦЕВТИКА И
ПРОЛОНГИРОВАННЫЕ ФОРМЫ
АНТИБИОТИКОВ**

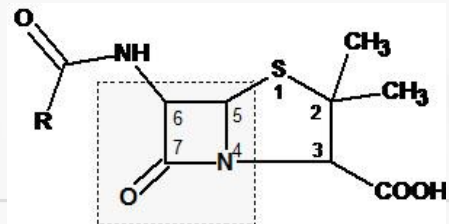
Егоров А.М., Рубцова М.Ю., Григоренко В.Г., Уляшова М.М.,
Преснова Г.В., Мажуга А.Г.

Лаборатория инженерной энзимологии

МИКРОБЫ ПРАВЯТ МИРОМ!



ПЕНИЦИЛЛИН -



первый природный антибиотик, который был использован в клинической медицине

1928 – 1942 гг Alexander Fleming, Howard Florey, Ernst Chain - открытие, изучение, организация промышленного выпуска пенициллина



Sir Alexander Fleming
(1881-1955)



Ernst Boris Chain
(1906-1979)



Sir Howard Walter Florey
www.rip.ru

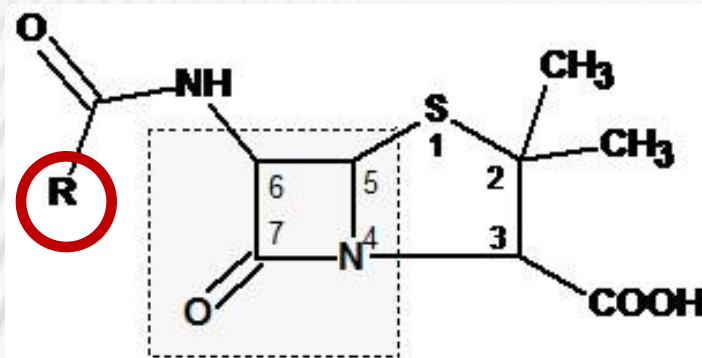


Ермольева З. В. - создатель отечественных антибиотиков в СССР

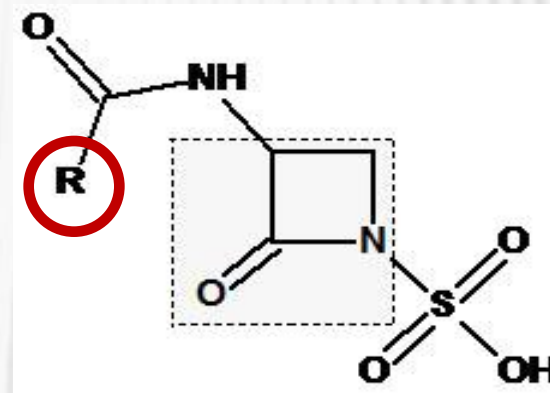
Лауреаты Нобелевской премии за 1945 г.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

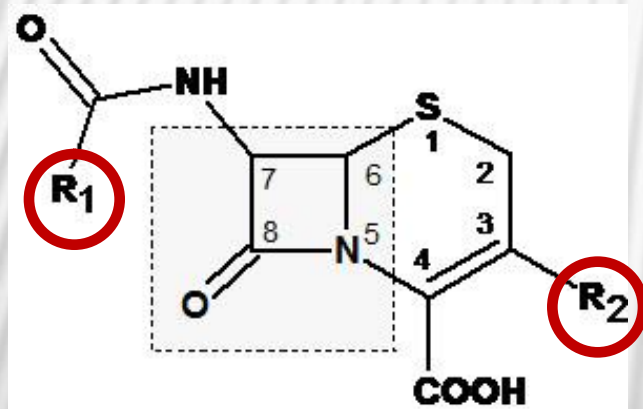
Пенициллины



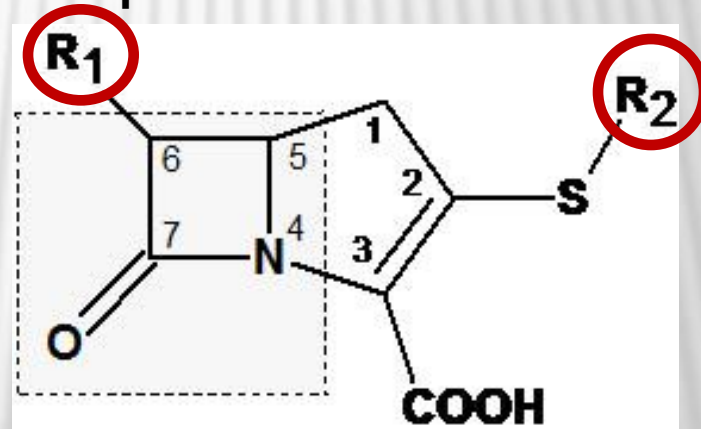
Монобактамы



Цефалоспорины



Карбапенемы



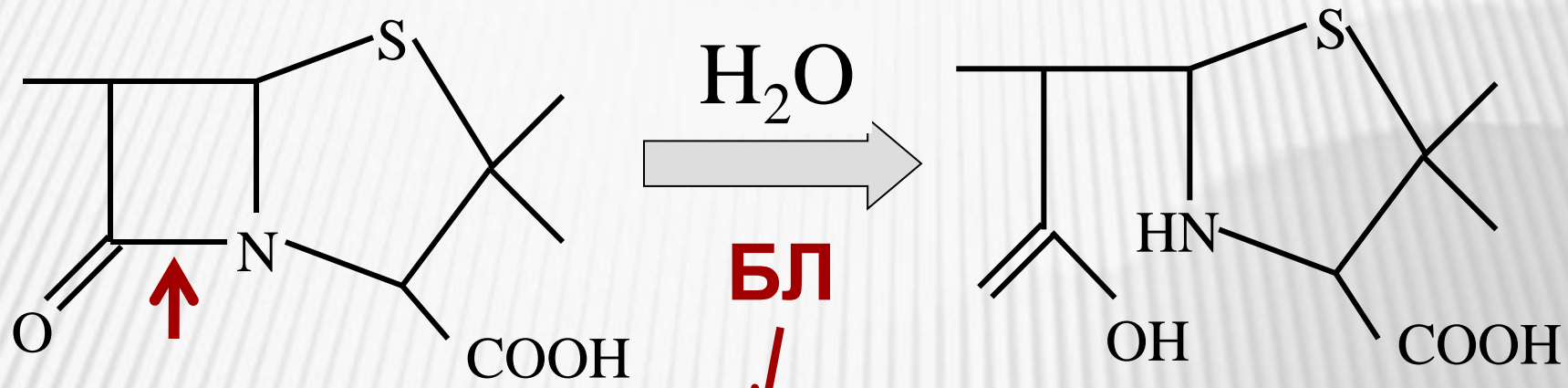
Бета-лактамы составляют 70 % всех используемых антибиотиков
(продажи в РФ составляют ~ 1 млрд. \$)



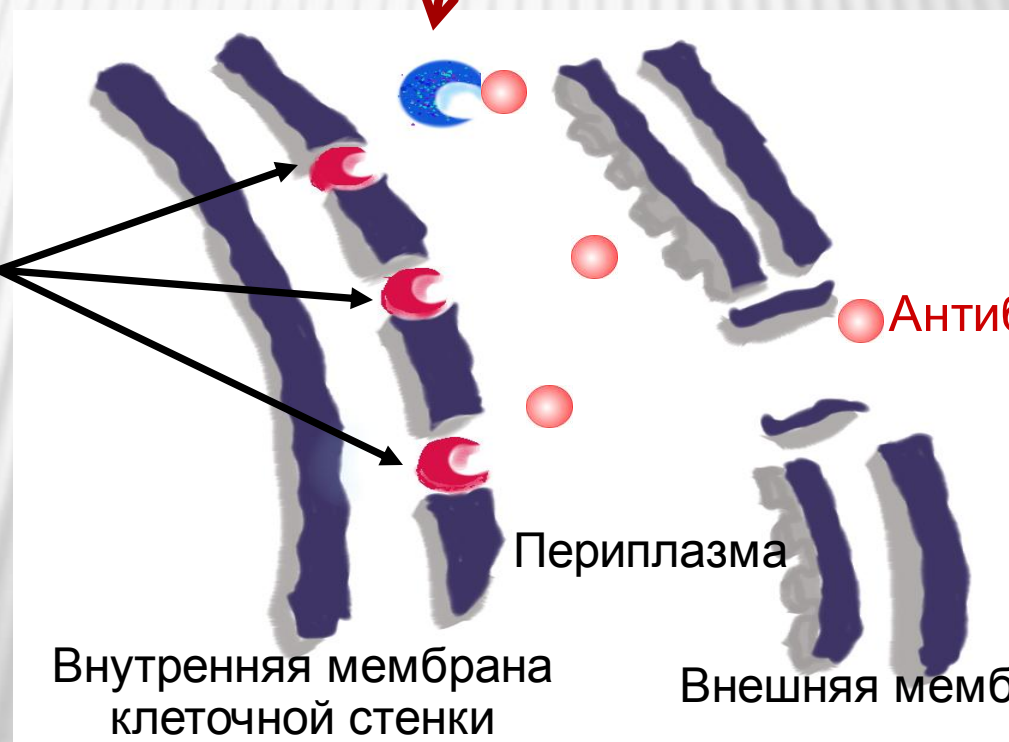
УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ (АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ)

Неэффективность бактерицидного действия пенициллинов и цефалоспоринов обусловлена бактериальными ферментами бета-лактамазами, расщепляющими бета-лактамное кольцо антибиотика

БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ (БЛ) - 1300 генетически различных ферментов с разной субстратной специфичностью



Пенициллин-связывающие белки (ПСБ)



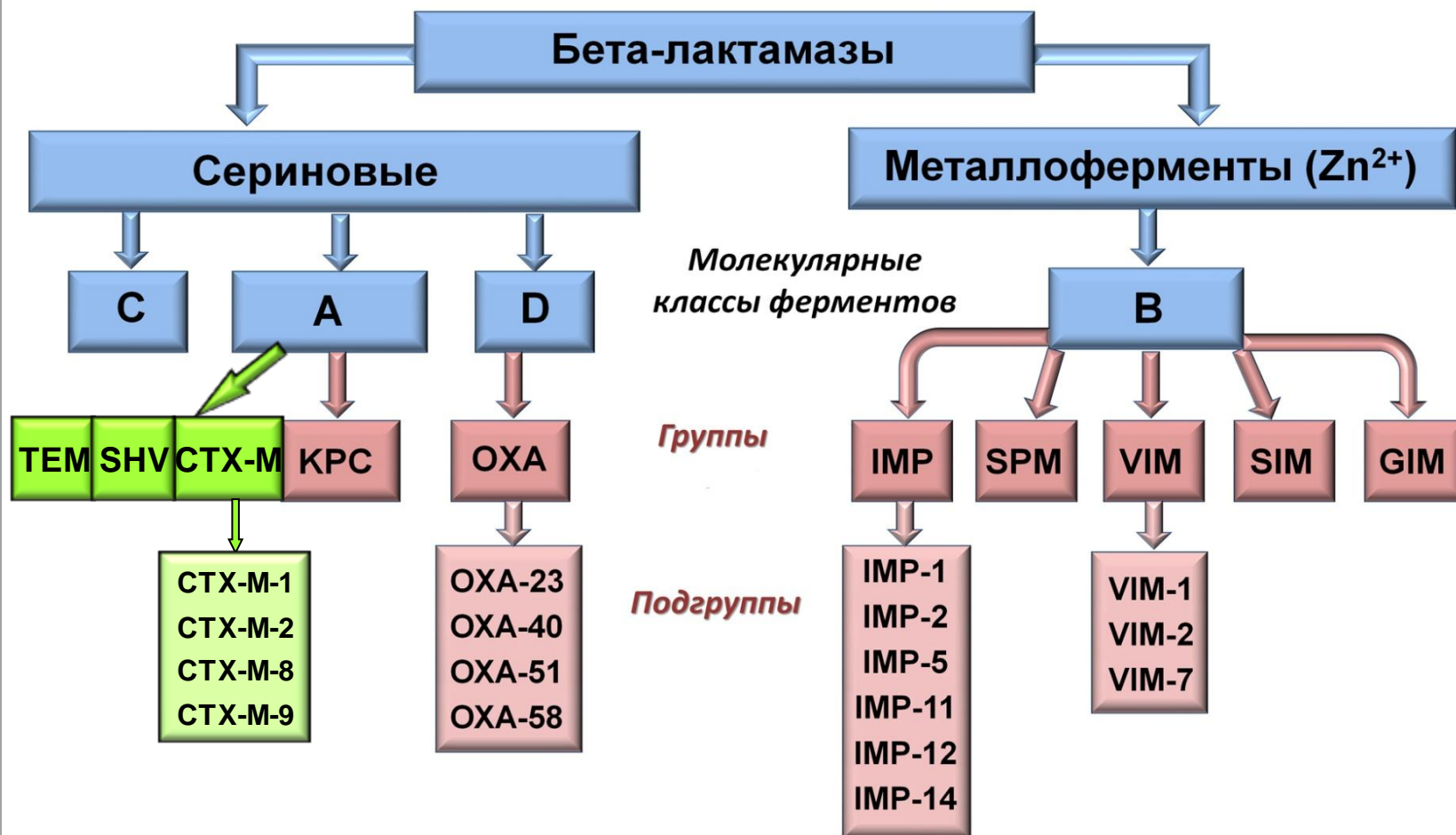
Антибиотик

Периплазма

Внутренняя мембрана клеточной стенки

Внешняя мембрана

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗ



РАЗНООБРАЗИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗ И ИХ ЭВОЛЮЦИЯ

Класс А:

TEM (более 200 субтипов)

SHV (170 субтипов)

CTX-M (160 субтипов)

KPC (22 субтипа)

Класс В

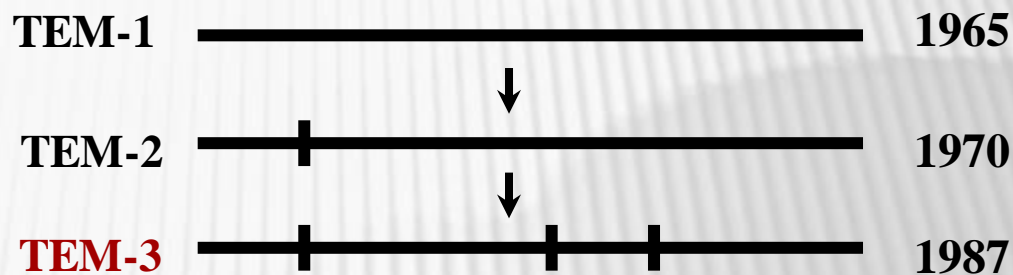
VIM (43 субтипа)

IMP (48 субтипов)

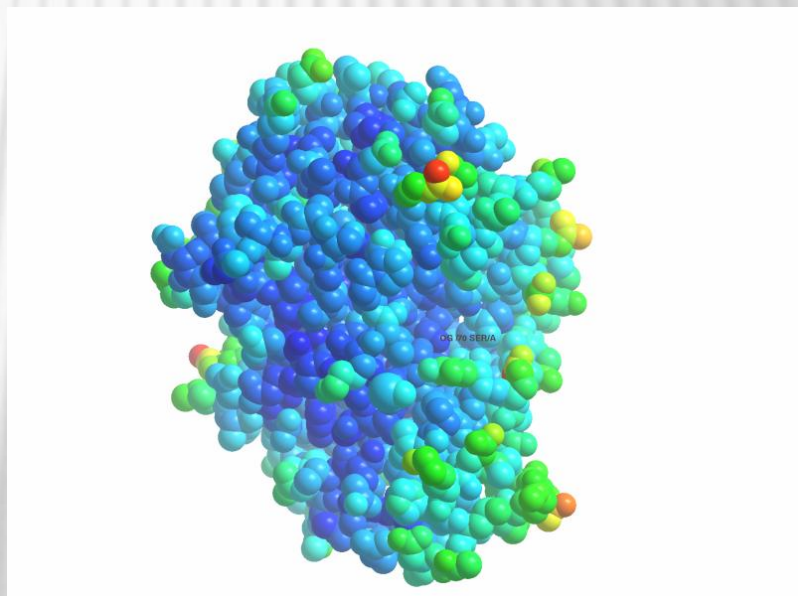
NDM (12 субтипов)

Класс D

OXA (400 субтипов)



Бета-лактамаза расширенного спектра (БЛРС)

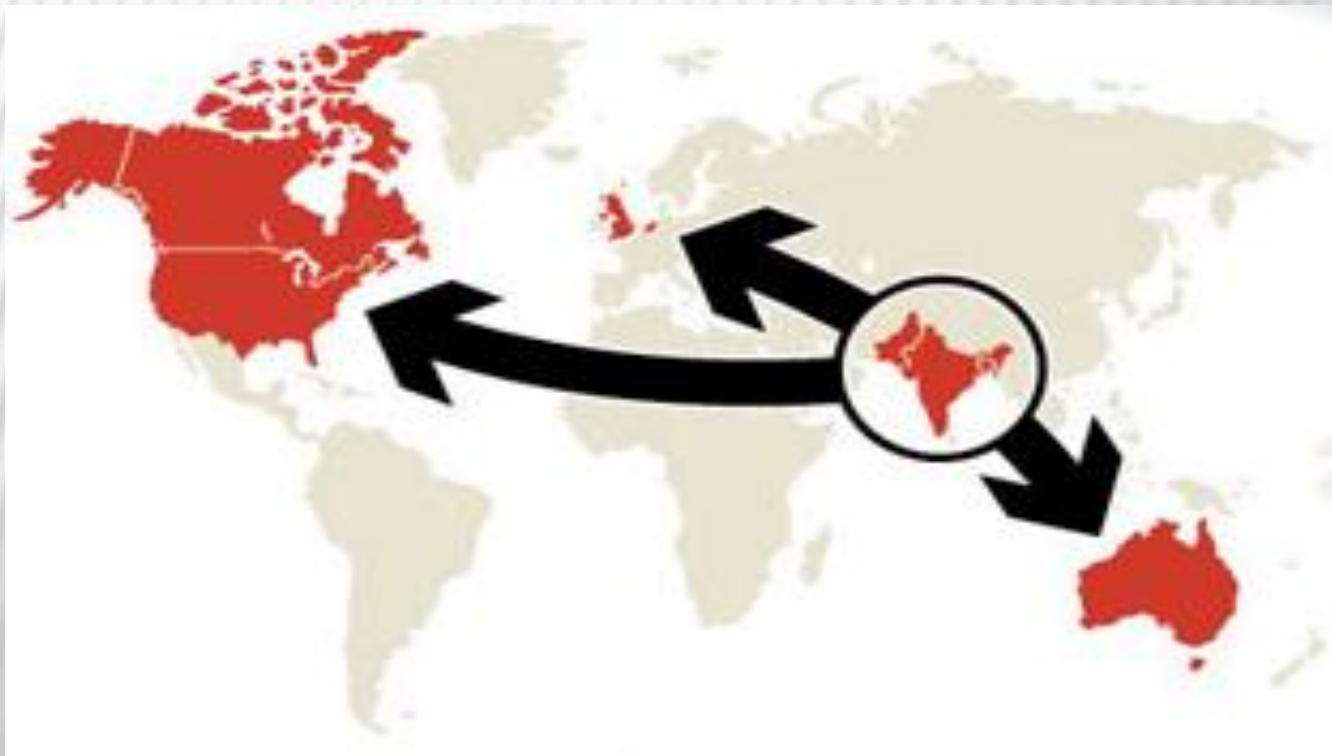


Молекулярная структура бета-лактамазы TEM-1

НОВЫЕ ИНФЕКЦИОННЫЕ УГРОЗЫ

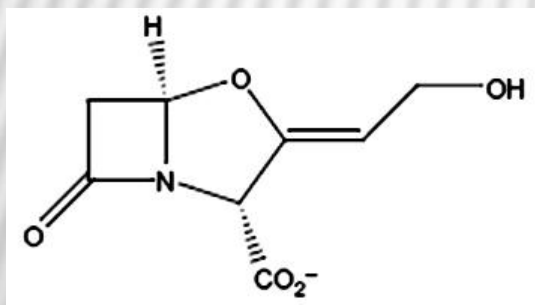


- **Поли**резистентность – устойчивость к нескольким антибиотикам
- **Пан**резистентность – устойчивость «супербактерий» практически ко всем антибиотикам вследствие продукции металло-бета-лактамазы NDM (Zn^{2+})

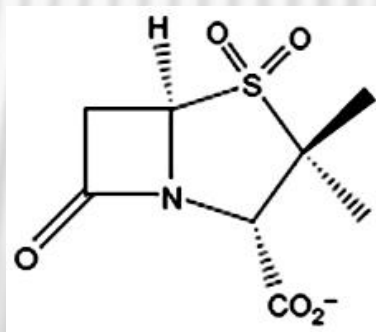


ИНГИБИТОРЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗ -

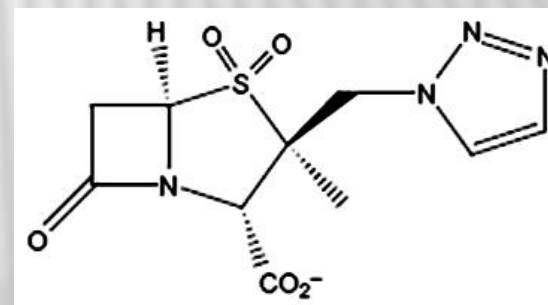
молекулы, необратимо связывающиеся с активным центром фермента и имеющие бета-лактамную структуру



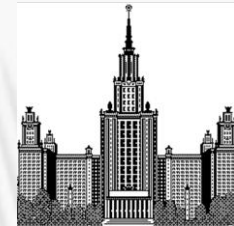
Клавулановая кислота
 $K_i = 35 \text{ нМ}$



Сульбактам
 $K_i = 400 \text{ нМ}$



Тазобактам
 $K_i = 40 \text{ нМ}$



ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

Москва

Химический факультет МГУ
имени М.В. Ломоносова
Лаборатория инженерной
энзимологии

Гамбург

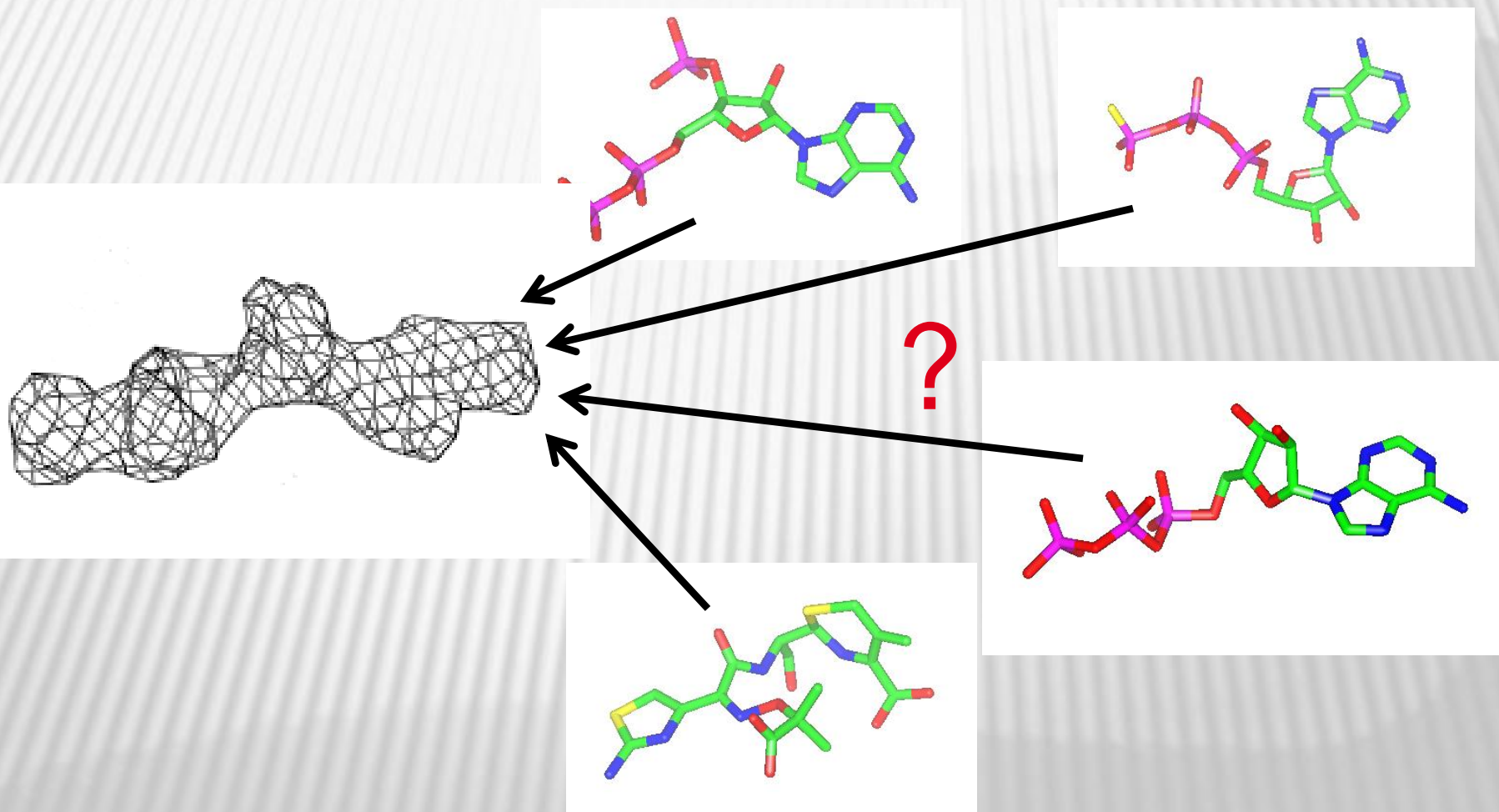
Европейская
молекулярно-биологическая
лаборатория

- Рекомбинантные бета-лактамазы
- Синтез новых ингибиторов
- Биохимический анализ

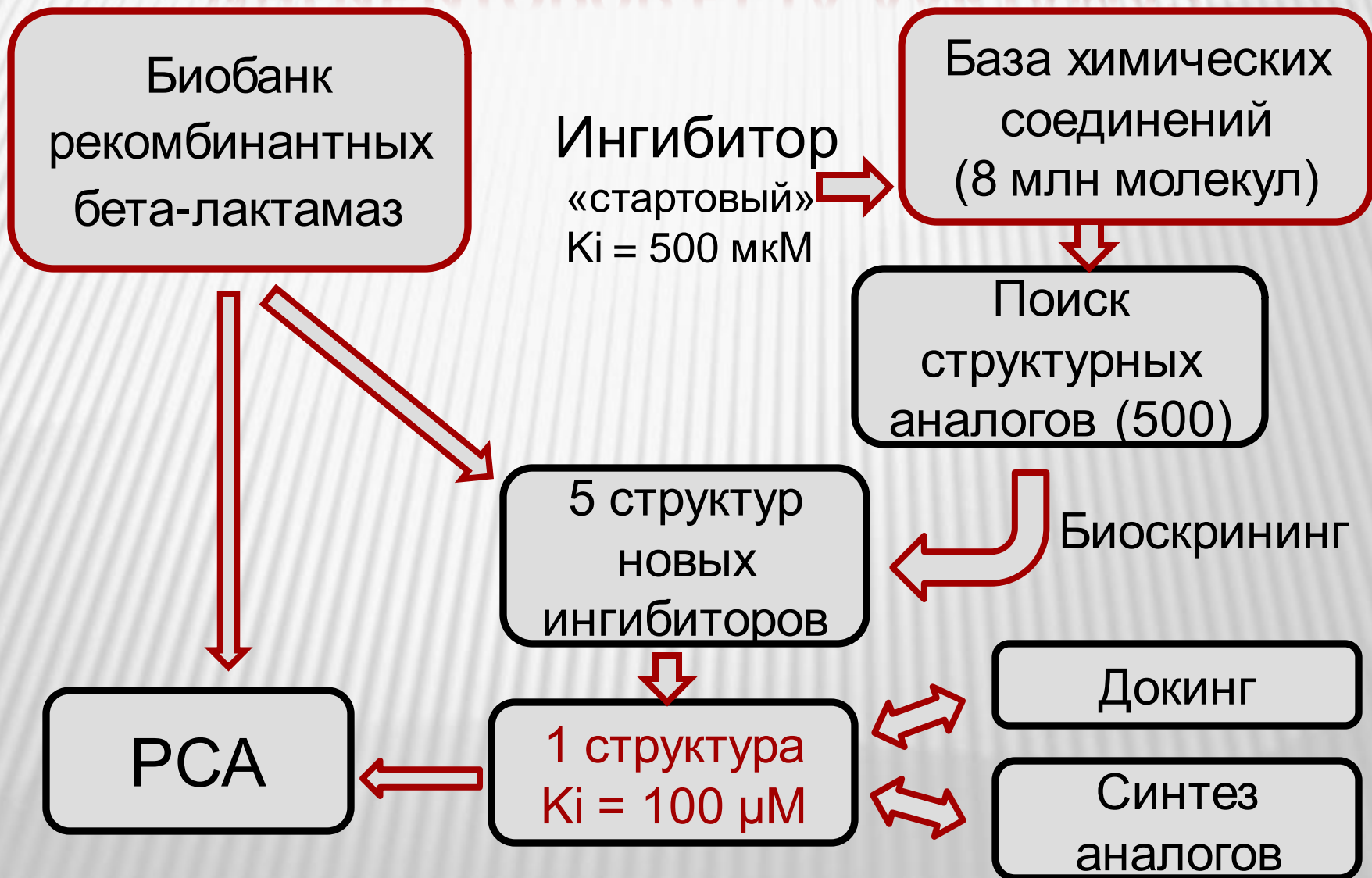
- Компьютерное моделирование
- Рентгено-структурный анализ

**Интегрированная платформа для создания
новых ингибиторов бета-лактамаз**

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ ОБРАЗОВ (EMBL)

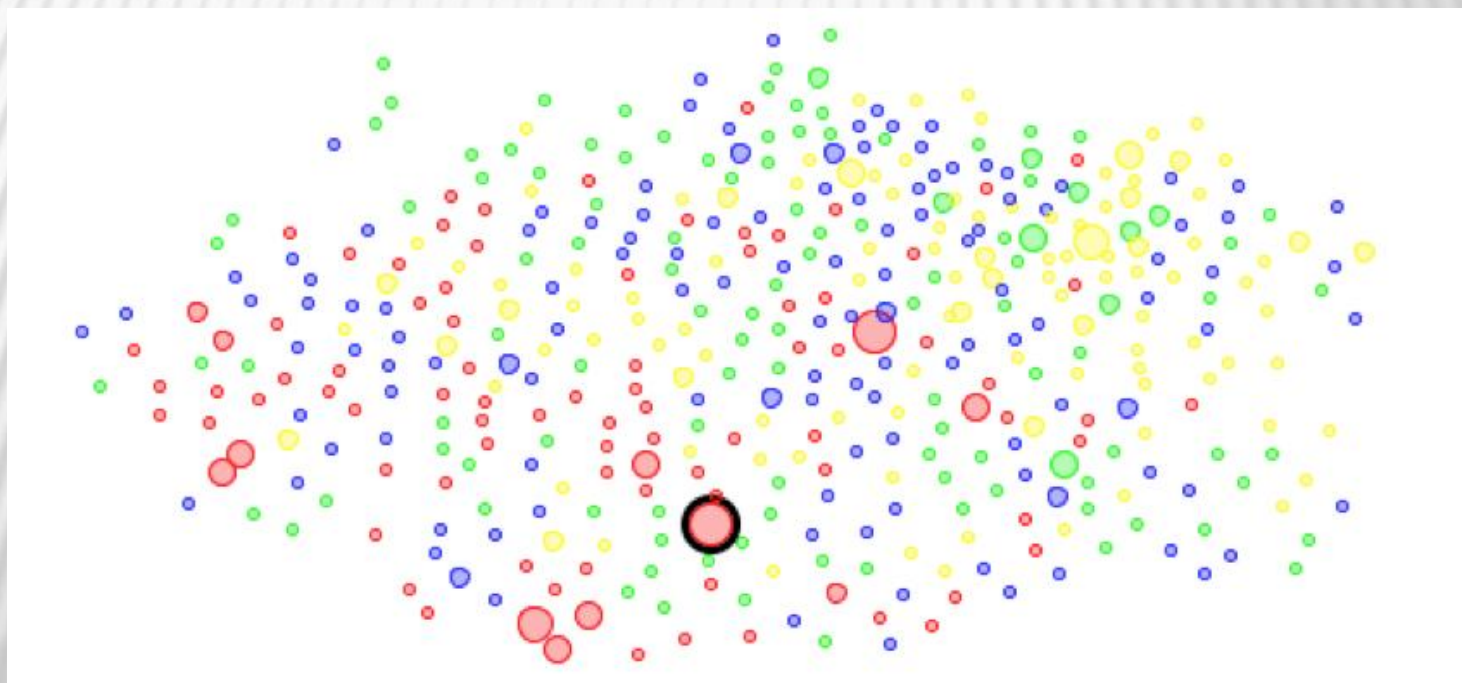


СТРАТЕГИЯ ПОИСКА НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

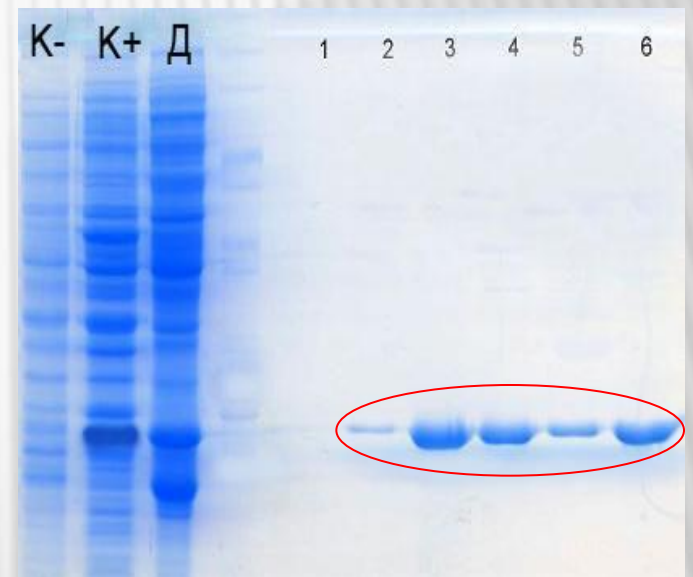
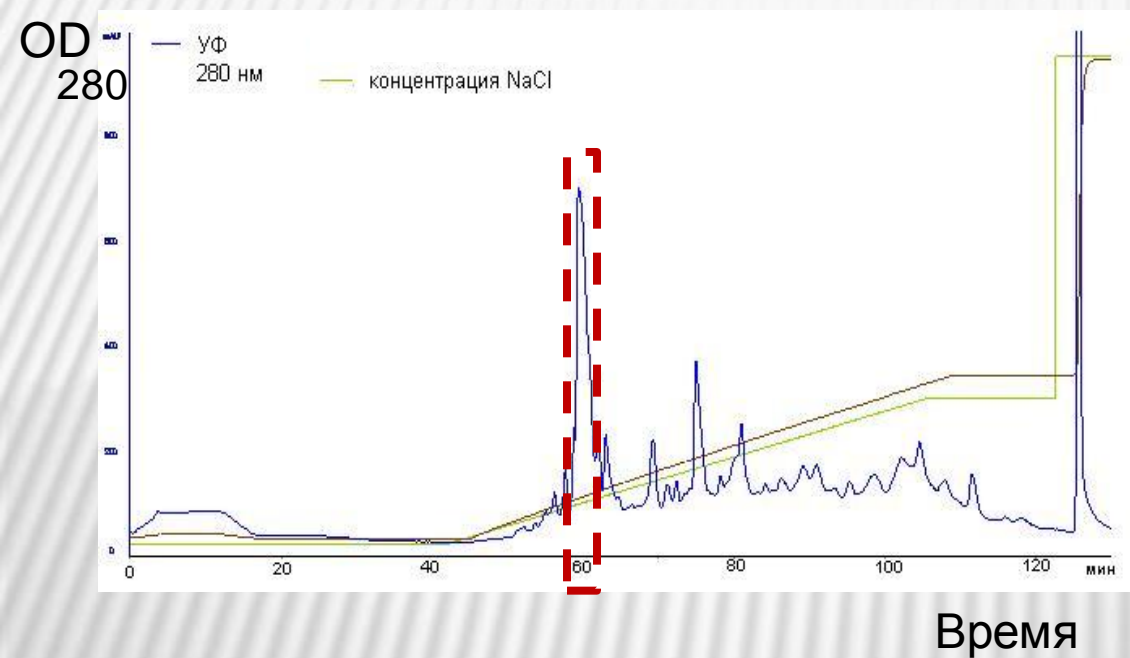


ЛИГАНД-СКРИНИНГ *IN SILICO* АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

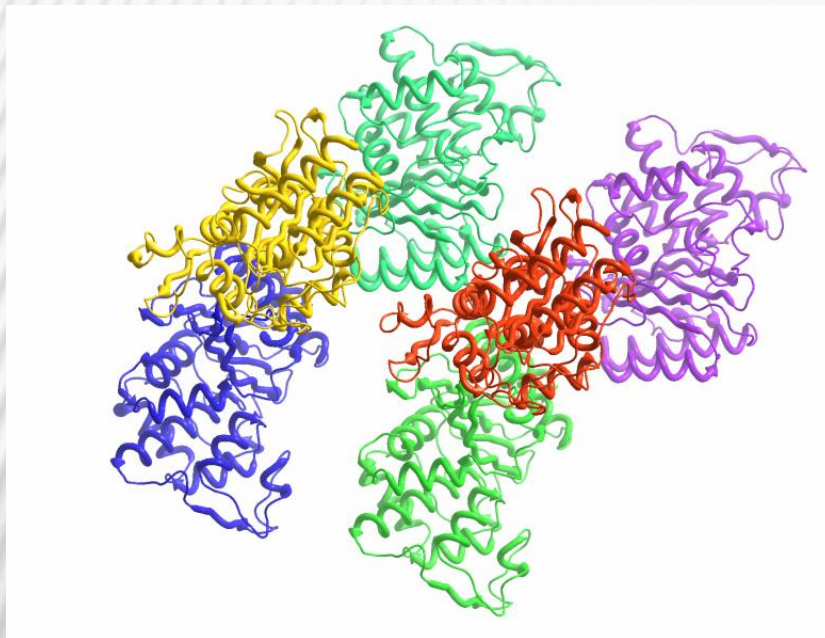
База данных ~ 8000000 соединений сканируется в течение нескольких часов (традиционный докинг-анализ будет занимать ~ 15 лет для того же набора данных)



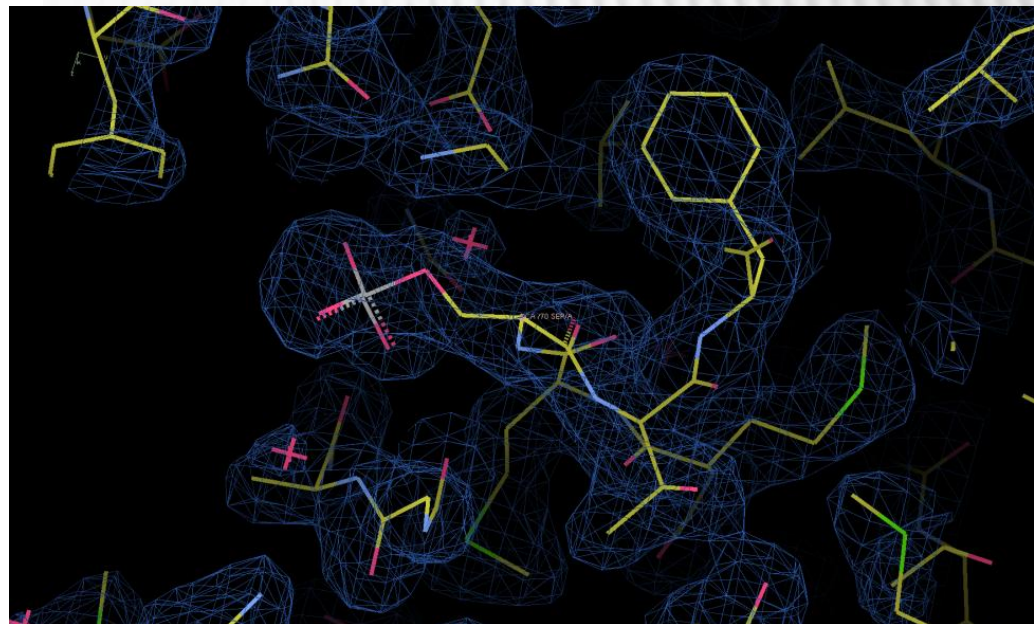
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ ТЕМ-1



РЕНТГЕНО-СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ TEM-1



Фрагмент ячейки РСА

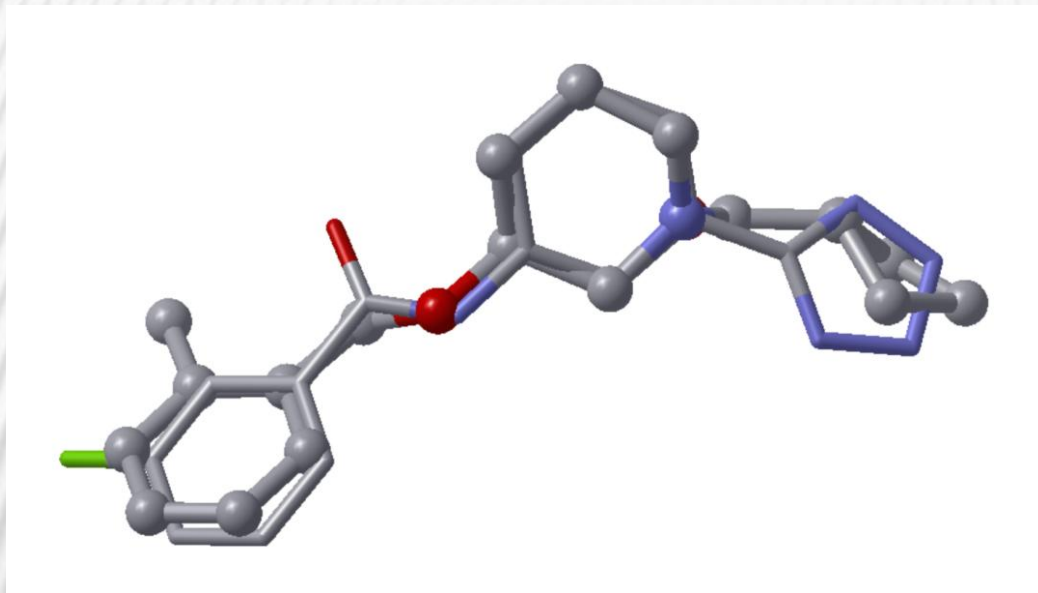


Активный центр фермента

БИОБАНК БЕТА-ЛАКТАМАЗ

Молекулярный класс бета-лактамаз	Биобанк рекомбинантных плазмид	Биобанк рекомбинантных штаммов <i>E.coli</i> DH5a, BL21(DE3)pLysS	Биобанк рекомбинантных ферментов
class A	TEM-1 TEM-29 TEM-30 TEM-31 TEM-79 TEM-143 CTX-M-2	TEM-1 TEM-29 TEM-30 TEM-31 TEM-79 TEM-143 CTX-M-2	TEM-1 CTX-M-2
class B	IMP-1 VIM-2 VIM-4	IMP-1 VIM-2 VIM-4	VIM-4
class D	OXA-40	OXA-40	

СИНТЕЗ НОВЫХ МОЛЕКУЛ – ИНГИБИТОРОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

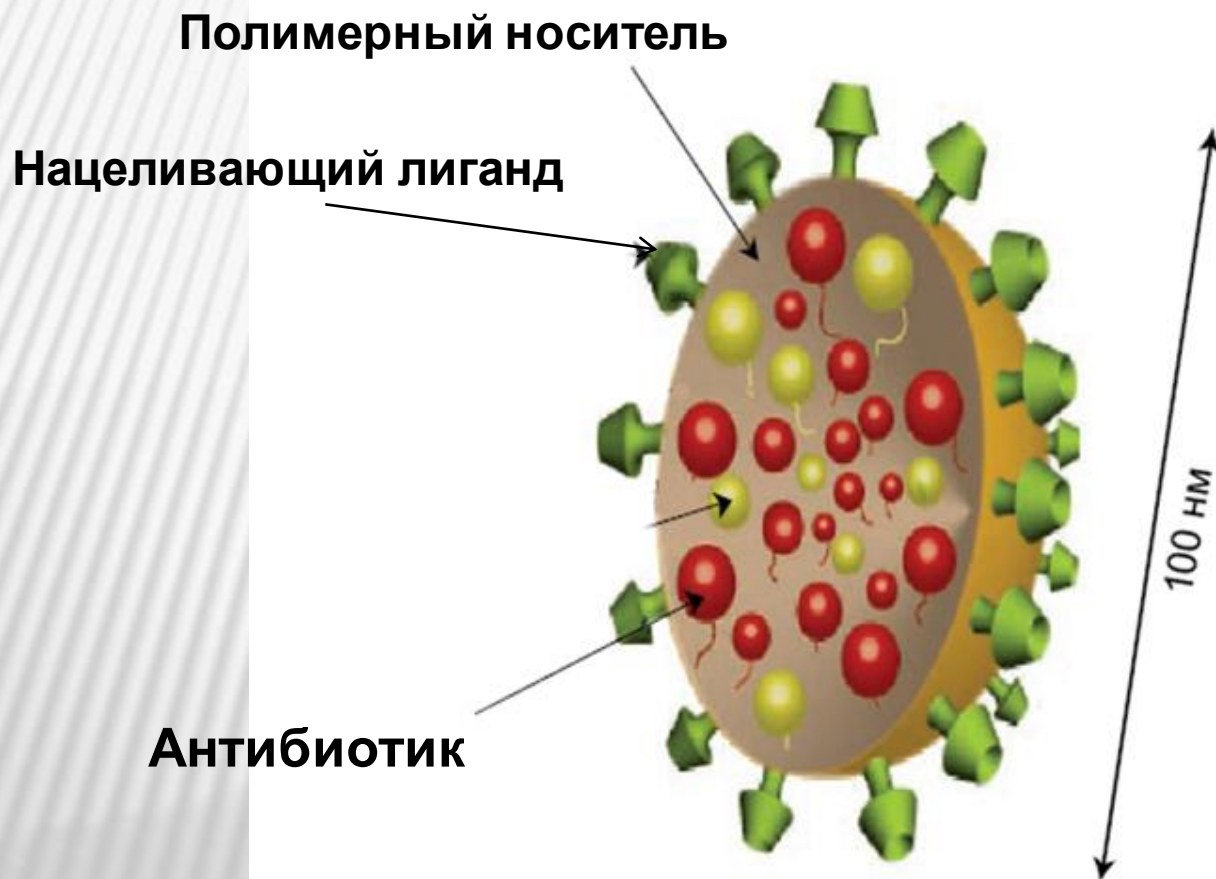


$K_i = 100 \text{ } \mu\text{M}$



$K_i = 1 - 10 \text{ nM}$

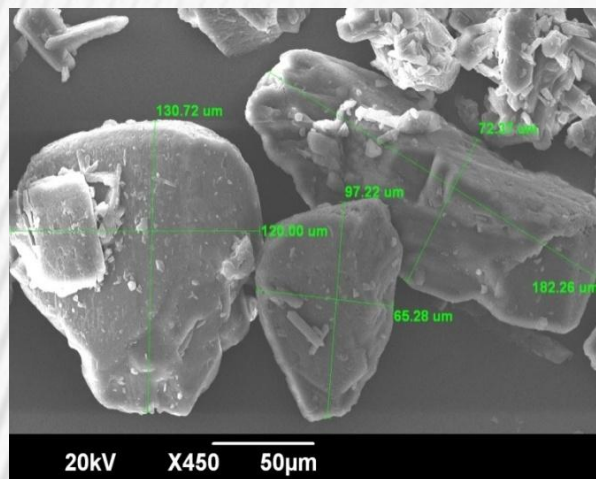
ПОЛУЧЕНИЕ НАНОПРЕПАРАТОВ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ



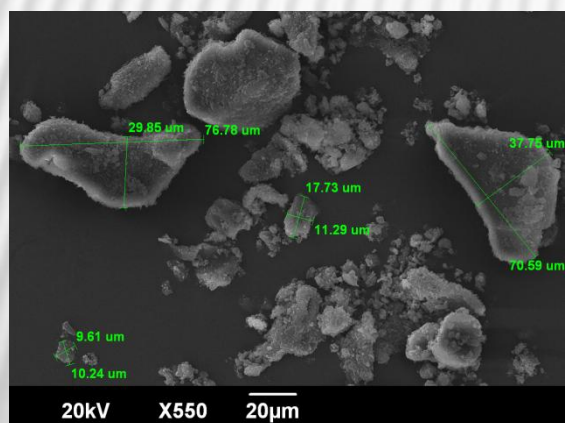
НОВЫЕ СВОЙСТВА АНТИБИОТИКОВ В ФОРМЕ НАНОПРЕПАРАТОВ

- Пролонгированное действие
- Увеличение активности антибиотиков в 10-200 раз
- Направленный транспорт в органы мишени
- Пиноцитоз наночастиц с антибиотиками для преодоления устойчивости клеточной стенки бактерий

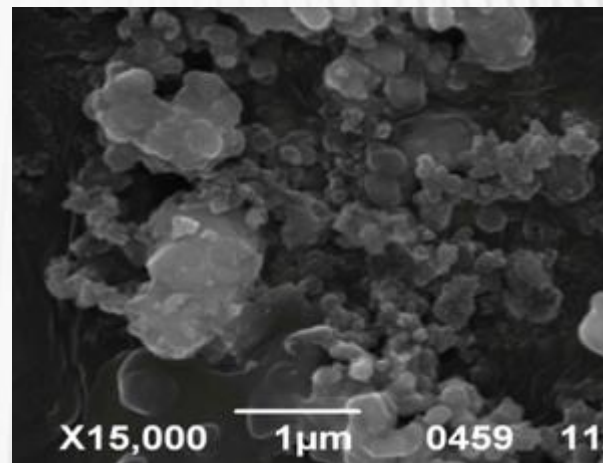
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЧАСТИЦ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ



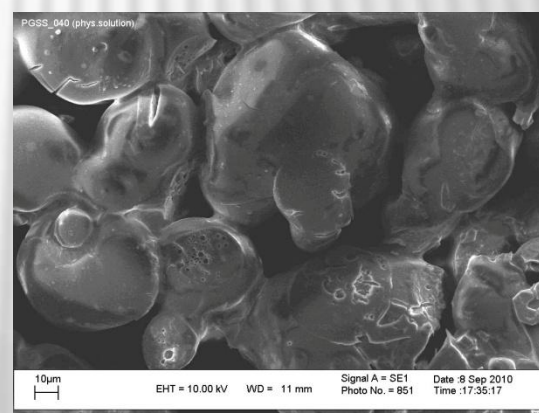
Исходная субстанция



Образец инкапсулированных частиц



Субстанция, микронизированная СКФ



Образец инкапсулированных частиц после выдержки в буфере при темп. 37°C в течение 10 дней

РЕНТГЕНОФАЗОВЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, МИКРОНИЗИРОВАННЫХ И ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ПОЛИМЕР



МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Микробиологические:



Проблемы:

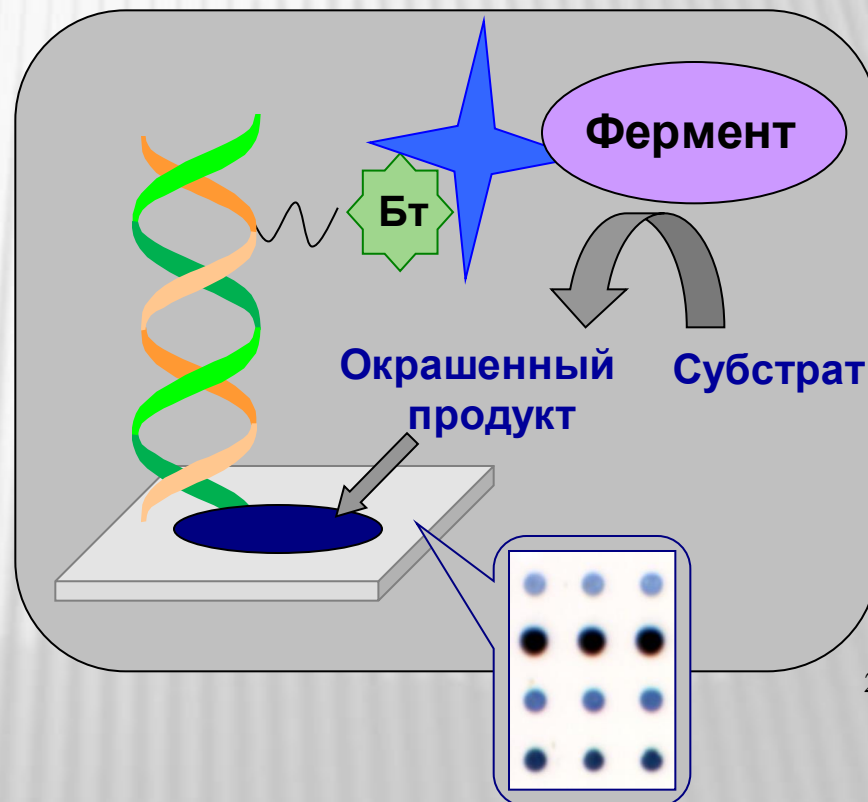
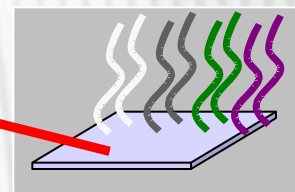
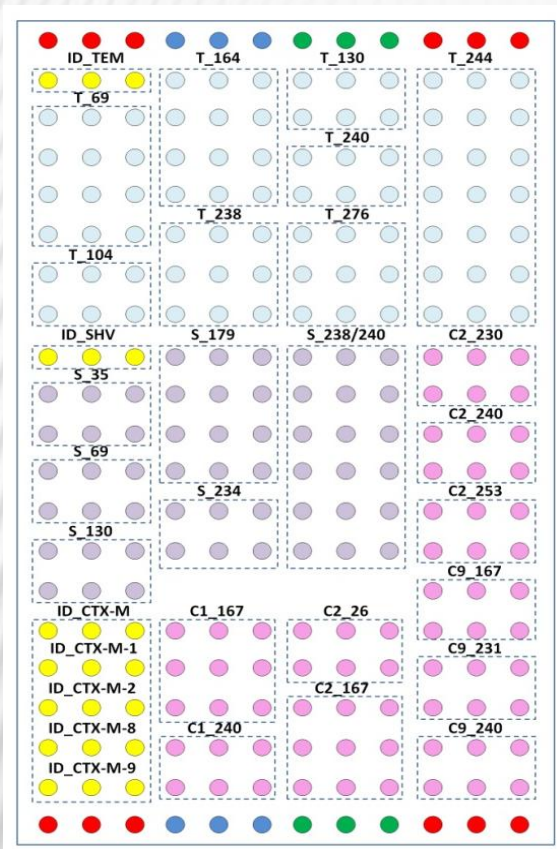
- длительность анализа
- величина МПК зависит от концентрации клеток в культуре
- детекция сложных типов резистентности

Молекулярно-генетические:

- секвенирование
- ПЦР в реальном времени
- мультианализ на микрочипах

Масс-спектрометрия

МИКРОЧИПЫ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ



Носитель: **наylon, 0,45 μm**

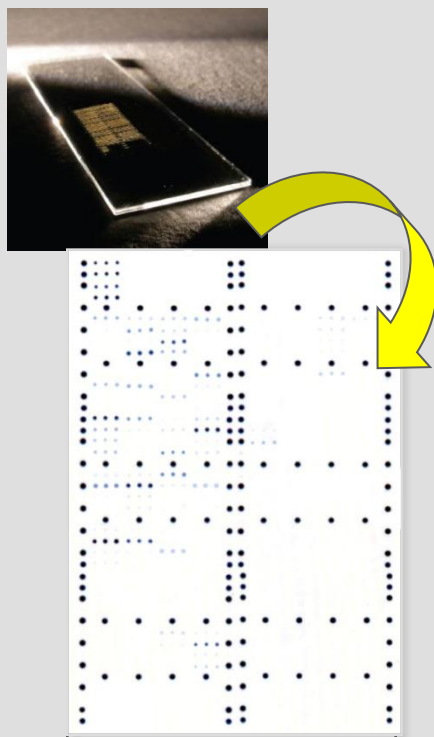
Размер чипа: **8 мм x 14 мм**

Диаметр зоны: **$\sim 350 \mu\text{m}$**

Количество зон: **246**

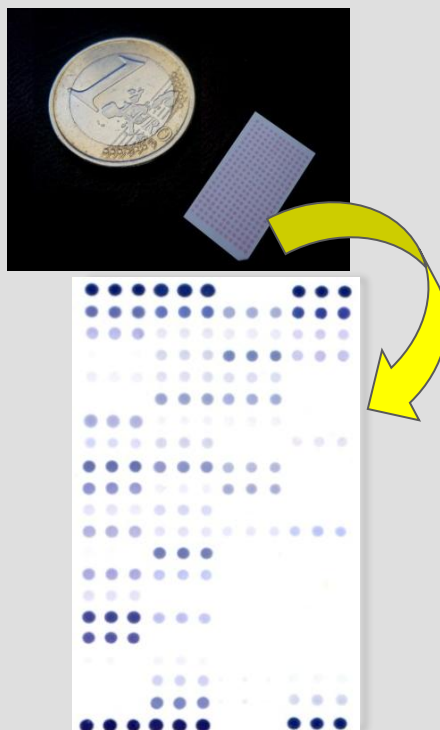
МИКРОЧИПЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

На стекле



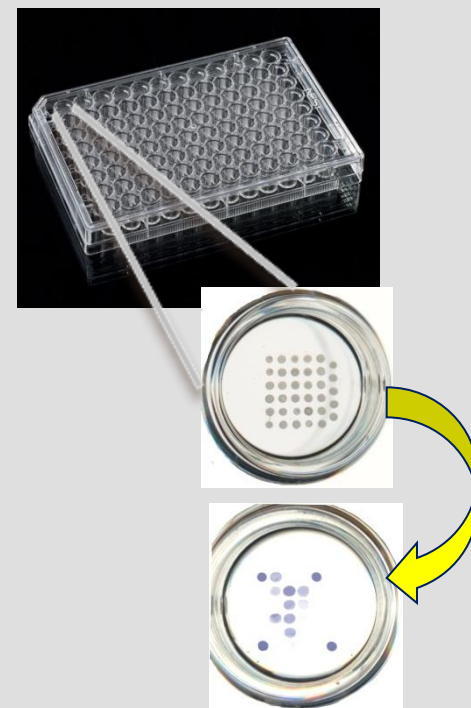
1000 зон/см²

На мембранном носителе



300 зон/см²

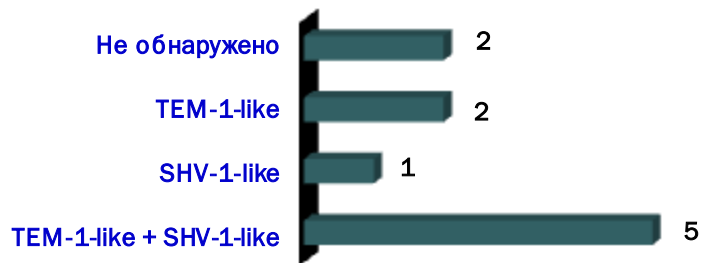
В лунках
96-луночных
планшетов



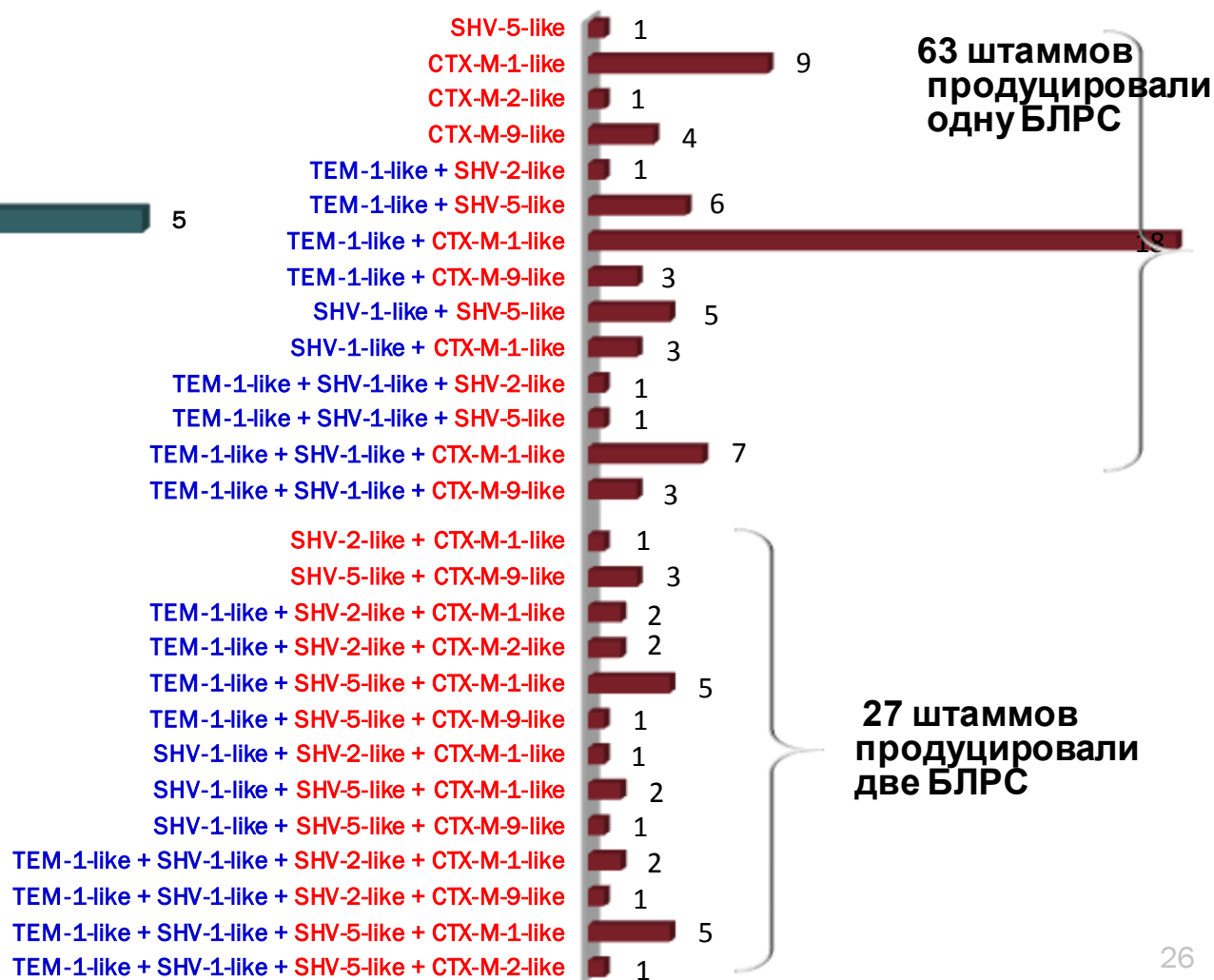
36 зон в лунке

АПРОБАЦИЯ МИКРОЧИПОВ НА КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ (N = 100)

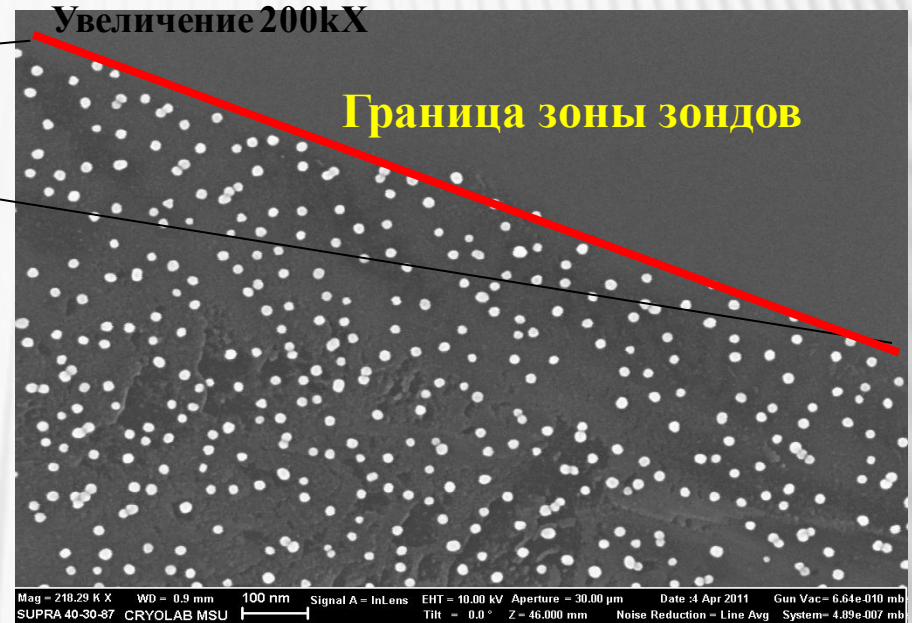
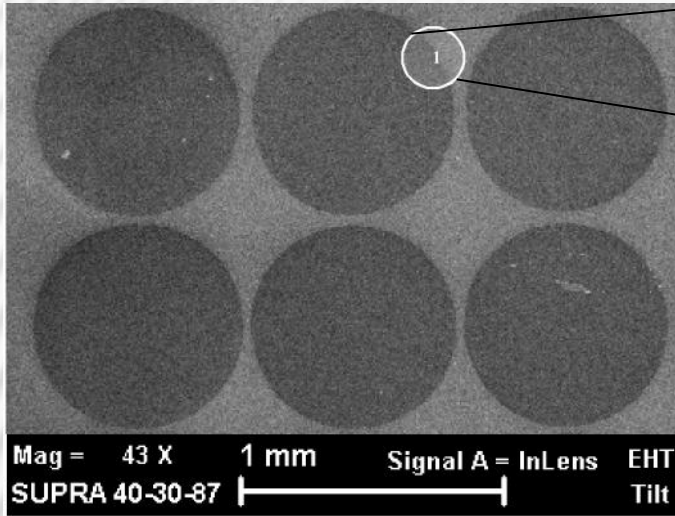
БЛРС – 0 (n = 10):



БЛРС+ (n = 90):



Сканирующая электронная микроскопия для микрочипов



Тип бета-лактамазы	Предел обнаружения ДНК, нг	
	Наночастицы золота/СЭМ	Колориметрическая детекция
СТХ-М-3	0,10	20
СТХ-М-5	0,01	10

БЛАГОДАРНОСТИ

- *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова*

Мажуга А.Г.

Упоров И.В.

- *Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Germany*

Prof. Rolf Schmid

Dr. Till Bachmann

- *European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany*

Ламзин В.С.

- *НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленская гос. мед. академия*

Эдельштейн М.В.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!