

Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova

Božica Solomun Kolanović, Nina Bilandžić*, Maja Đokić, Ivana Varenina, Marija Sedak

Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut, Savska 143, 10000 Zagreb, Hrvatska

pregledni rad

Sažetak

Antimikrobni lijekovi su kemoterapeutici koji imaju široku primjenu u humanoj, veterinarskoj i stočarskoj praksi. Beta-laktamski su najraširenija skupina antimikrobnih lijekova koja se zbog vrlo snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koristi u humanoj i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija. Dije se u skupine penicilina, cefalosporina i monobaktama. Penicilini se dobivaju iz filtrata kulture plijesni *Penicillium notatum* i *Penicillium chrysogenum*, a cefalosporini iz filtrata kulture aktinomiceta (*Cephalosporium acremonium*). Istraživanja su omogućila otkrića aktivne skupine, 6-amino-penicilanske kiseline čijim je izdvajanjem omogućena proizvodnja polusintetskih penicilina koji su nadišli ograničenja prirodnog penicilina G. Fizikalno-kemijska svojstva beta-laktama mogu se mijenjati supstitucijom vodika u karboksilnoj skupini penicilina, odnosno modifikacijom bočnog lanca cefalosporina. Time se povećala otpornost na djelovanje β -laktamaza i proširen spektar djelovanja. Beta-laktami u terapijskim koncentracijama djeluju baktericidno inhibirajući sintezu stanične stijenke bakterija. Penicilini su važni za antibakterijsku kemoterapiju, često u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima. Cefalosporini se primjenjuju kao zamjena za peniciline u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama te u profilaksi pri kirurškim zahvatima. Primjena beta-laktama u životinja koje se koriste kao hrana može dovesti do ostataka tih lijekova u mesu i mesnim prerađevinama, te mlijeku i jajima. Unošenje antimikrobnih lijekova u ljudski organizam hranom, osobito je opasno zbog njihove direktne toksičnosti odnosno kancerogenosti, utjecaja na sastav crijevne mikroflore, mogućih alergijskih reakcija, te pojave otpornosti pojedinih patogenih mikroorganizama, te je njihovo određivanje nužno. Obzirom da se puno koriste u tretmanu mastitisa najčešće su utvrđeni antimikrobni lijekovi u mlijeku. U svrhu određivanja ostataka beta-laktama u hrani životinjskog podrijetla primjenjuju se screening mikrobiološke metode, a identifikacija i kvantifikacija danas se provodi najčešće tekućinskom kromatografijom tandemskom spektrometrijom masa.

Ključne riječi: beta-laktami, kemoterapeutici, sinteza, hrana životinjskog podrijetla

Antimikrobni lijekovi

Antimikrobni lijekovi su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterijama, plijesnima, virusima, protozoama) sprječavajući im rast ili ih uništavajući (Šeol i sur., 2010). Antimikrobni lijekovi koji zaustavljaju rast bakterija imaju bakteriostatsku aktivnost (npr. kloramfenikol). Smrt bakterijskih stanica uzrokuju baktericidni antimikrobni lijekovi koji smanjuju broj bakterija kao što je slučaj kod penicilina. Neki antimikrobni lijekovi i mogu ovisno o okolnostima posjedovati baktericidnu ili bakteriostatsku aktivnost. Antimikrobni lijekovi i mogu biti prirodni proizvodi mikroorganizama ili sintetski proizvodi. Većina antimikrobnih lijekova koji se u posljednjih 70 godina koriste u kliničke svrhe u liječenju infektivnih bolesti kod ljudi su prirodni antimikrobni lijekovi koje proizvode bakterije ili plijesni (Walsh, 2003). Antimikrobni

lijekovi mogu imati usko, prošireno ili široko antimikrobno djelovanje. Tako se antimikrobni lijekovi uskog spektra djelovanja primjenjuju za točno određene vrste gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterija. Antimikrobno djelovanje antimikrobnih lijekova proširenog spektra koristi se u suzbijanju gram-pozitivnih bakterija i točno određenih vrsta gram-negativnih bakterija. Antimikrobni lijekovi širokog spektra koriste se u suzbijanju i gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta.

Prema kemijskoj strukturi antimikrobne lijekove svrstavamo u β -laktame, aminoglikozide, tetracikline, makrolide, poliene, peptide i ostale antimikrobne lijekove. Prema mehanizmu djelovanja antimikrobnih lijekova svrstavamo u četiri skupine odnosno one: koji inhibiraju sintezu stanične stijenke (β -laktami i bacitracin), koji oštećuju citoplazmatsku membranu (polimiksini i polienski antimikrobni lijekovi), koji inhibiraju sintezu proteina (aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi,

*Corresponding author: Laboratory for Residue Control, Department of Veterinary Public Health, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; bilandzic@veinst.hr

streptogramini, oksasolidinoni i glicilicini) i koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina (sulfonamidi i kinoloni) (Šeol i sur., 2010).

Beta-laktami su najraširenija skupina antimikrobnih lijekova koja se zbog vrlo snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koriste u humanoj i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija (Kunec-Vajić i sur., 1993). Dijele se u tri skupine: peniciline (benzilpenicilin, penicilin V, oksacilin, amoksicilin, ampicilin, kloksacilin), cefalosporine (cefaleksin, cefazolin, ceftiofur, cefapirin, cefkvinom, cefuroksim, cefoperazon i dr.) te monobaktame (Gentili i sur., 2005). Penicilini su antimikrobni lijekovi koji se dobivaju iz filtrata kulture plijesni *Penicillium notatum* i *Penicillium chrysogenum*. Cefalosporini se dobivaju iz filtrata kulture aktinomiceta (*Cephalosporium acremonium*) (Laurence i Bennett, 1988).

Povijesni pregled proizvodnje β -laktamskih antimikrobnih lijekova

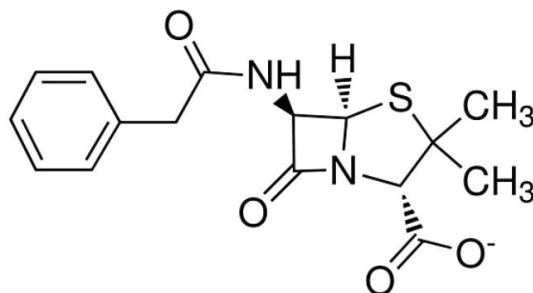
Moderna terapija antimikrobnim lijekovima započela je otkrićem β -laktama 1929. godine kada je Alexander Fleming objavio svoje istraživanje o inhibiciji rasta *Staphylococcus aureus* na ploči agara kontaminiranoj plijesnima *Penicillium notatum*. Iz kulture ove plijesni 1940. godine Chain i Florey proizveli su prvu veću količinu penicilina, a već desetak godina kasnije penicilin G ušao je u kliničku uporabu (Šeol i sur., 2010). Brojna istraživanja koja su uslijedila dovela su do otkrića aktivne skupine, 6-amino-penicilanske kiseline čijim je izdvajanjem omogućena proizvodnja polusintetskih penicilina koji su nadišli ograničenja penicilina G. 1948. godine u

gradu Cagliari (Sardinija, Italija) iz Sredozemnog mora izolirana je plijesan *Cephalosporium acremonium* (kasnije nazvana *Acremonium chrysogenum*) koja proizvodi cefalosporin C. Tek 1961. godine razvojem NMR (nuklearna magnetska rezonancija) spektroskopije otkrivena je i njegova struktura (Graham, 1995; Brakhage i sur., 2005). Otkrićem cefalosporina C razvila se cijela skupina klinički značajnih β -laktama sa sposobnošću prodiranja u gram-negativne bakterije i otpornošću prema β -laktamazama. Otkriveno je da ih proizvode i gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Pokazalo se da gram-pozitivna bakterija *Streptomyces clavuligenes* proizvodi klavulansku kiselinu i cefamicin C, derivat cefalosporina te da gram-negativna bakterija *Lysobacter lactamgenus* sintetizira cefabacine. Industrijska proizvodnja penicilina i cefalosporina postigla se primjenom *Penicillium chrysogenum* i *Acremonium chrysogenum*. Najveći uspjeh u otkrivanju molekularne regulacije biosinteze β -laktama u plijesnima postignut je primjenom *Aspergillus nidulans*, plijesni iz razreda askomiceta koje prolaze spolni ciklus (Brakhage i sur., 2005).

Kemijska struktura i svojstva β -laktama

Penicilinski antimikrobni lijekovi

Osnovna građevna jedinica molekule penicilina je kemijski nestabilna 6-aminopenicilanska kiselina koja u svojoj molekuli sadrži jedan tiazolidinski prsten i jedan β -laktamski prsten koji su osnova antibakterijskih svojstava penicilina (Slika 1.) (Fagerquist i Lightfield, 2003).



Slika 1. Osnovna struktura penicilinskih antimikrobnih lijekova (Strohl, 1997)

Fig. 1. Basic structure of penicilline antimicrobial drugs (Strohl, 1997)

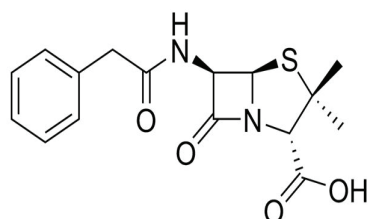
Penicilin je slaba organska kiselina, netopljiva u vodi (Kunec-Vajić i sur., 1993). Djelovanjem enzima mikroorganizama β -laktamaze (penicilinaze) i amidaze penicilini podliježu razgradnji. Cijepanjem

β -laktamskog prstena (C-N veze na C7-atomu) nastaje penicilinska kiselina i gubi se antibakterijska aktivnost penicilina.

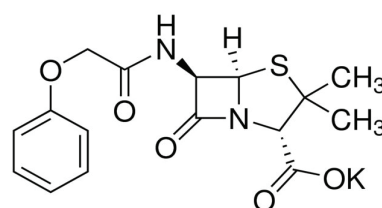
Kiseli radikal na aminoskupini (R-NH) β -laktamskog prstena može se odcijepiti pomoću enzima amidaze. Tako nastaje 6-aminopenicilinska kiselina koja je polazna supstanca za sintezu polusintetskih penicilina (Kunec-Vajić i sur., 1993). Acilni ostatak aminoskupine ove kiseline je ovisno o fermentacijskom mediju promjenjiv te se dodavanjem raznih radikala dobivaju penicilini s različitim spektrom djelovanja (Slika 2.).

Danas se 6-aminopenicilinska kiselina proizvodi hidrolizom penicilina G ili penicilina V djelovanjem

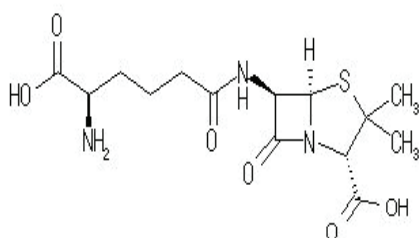
enzima penicilin acilaza ili kemijskim metodama, što je puno efikasnije od postupka fermentacije (Graham, 1995). Fizikalno-kemijska svojstva penicilina mogu se također mijenjati, i to supstitucijom vodika u karboksilnoj skupini. Zamjenom vodika kalijem ili natrijem dobivaju se dobro topljive soli penicilina koje su u suhom stanju stabilne i koriste se u proizvodnji farmaceutskih preparata. Otopine penicilina su vrlo nestabilne te se moraju pripremati neposredno prije kemijske analize (Kunec-Vajić i sur., 1993).



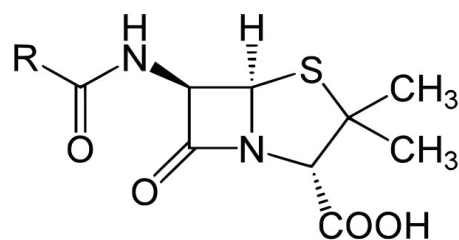
Penicilin G (benzil penicilin)



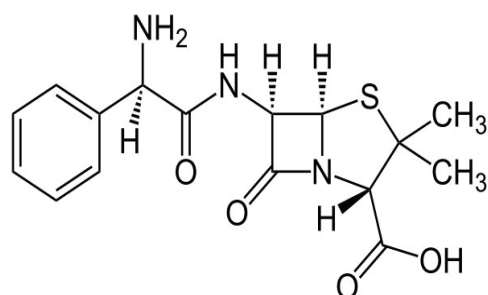
Penicilin V (fenoksimetil penicilin)



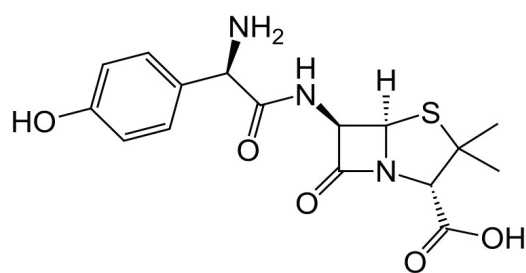
Penicilin N



Penicilin T



Ampicilin



Amoksicilin

Slika 2. Kemijska struktura penicilinskih antimikrobnih lijekova (Graham, 1995)

Fig. 2. Chemical structure of penicilline antimicrobial drugs (Graham, 1995)

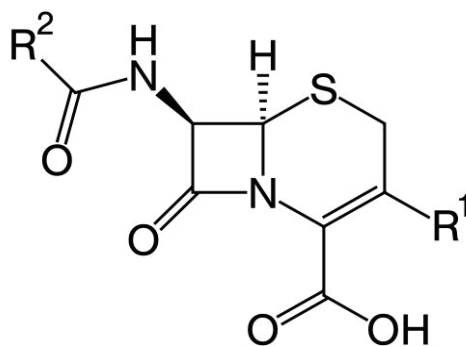
Zbog prisutnosti četveročlanog prstena penicilinski antimikrobni lijekovi su izrazito termolabilni te skloni izomerizaciji u kiselom okruženju, pa je tijekom postupka pripreme uzorka potreban poseban

oprez kako bi se spriječila razgradnja ovih spojeva. Vrijeme poluraspada benzil penicilina (penicilina G) pri pH 1-2 i 20 °C je 20 minuta (Holstege i sur., 2002.) Osobito je nestabilan u kiseloj sredini želuca

pa nije učinkovit ako se primjenjuje oralno. Također, izrazito je osjetljiv na djelovanje β -laktamaze i relativno je neaktivan protiv gram-negativnih bakterija. Stoga je svrha proizvodnje polusintetskih penicilinskih analoga pronalazak supstance koja nadilazi ova ograničenja penicilina G.

Osjetljivost prema kiselinama prvenstveno je rezultat velike torzijske napetosti bicikličkog sistema penicilina G. U kiseloj sredini napetost se smanjuje otvaranjem četveročlanog prstena. Osim toga, karbonilna skupina β -laktamskog prstena je podložna nukleofilnom napadu i stoga visoko reaktivna. Nestabilnosti u kiseloj sredini doprinosi i acilna skupina koja aktivno sudjeluje u mehanizmu otvaranja β -laktamskog prstena. Kada

bi za karbonilnu skupinu bila vezana skupina s dobrim sposobnostima odvlačenja elektrona smanjila bi se nukleofilnost karbonilnog kisika. Tako primjerice penicilin V na acilnom ostatku ima elektronegativan kisik s efektom odvlačenja elektrona pa je stabilnost ovog spoja u kiseloj sredini želuca visoka i moguća je njegova oralna primjena. Međutim, penicilin V je kao i penicilin G osjetljiv na djelovanje β -laktamaze i pokazuje slabiju aktivnost. Ampicilin i amoksicilin pokazuju bolju aktivnost prema gram-negativnim bakterijama te zahvaljujući amino skupini bolju stabilnost prema kiselinama, ali su kao i penicilin G osjetljivi na djelovanje β -laktamaze (Graham, 1995).



Slika 3. Kemijska struktura 7-amino-cefalosporinske kiseline (Graham, 1995)

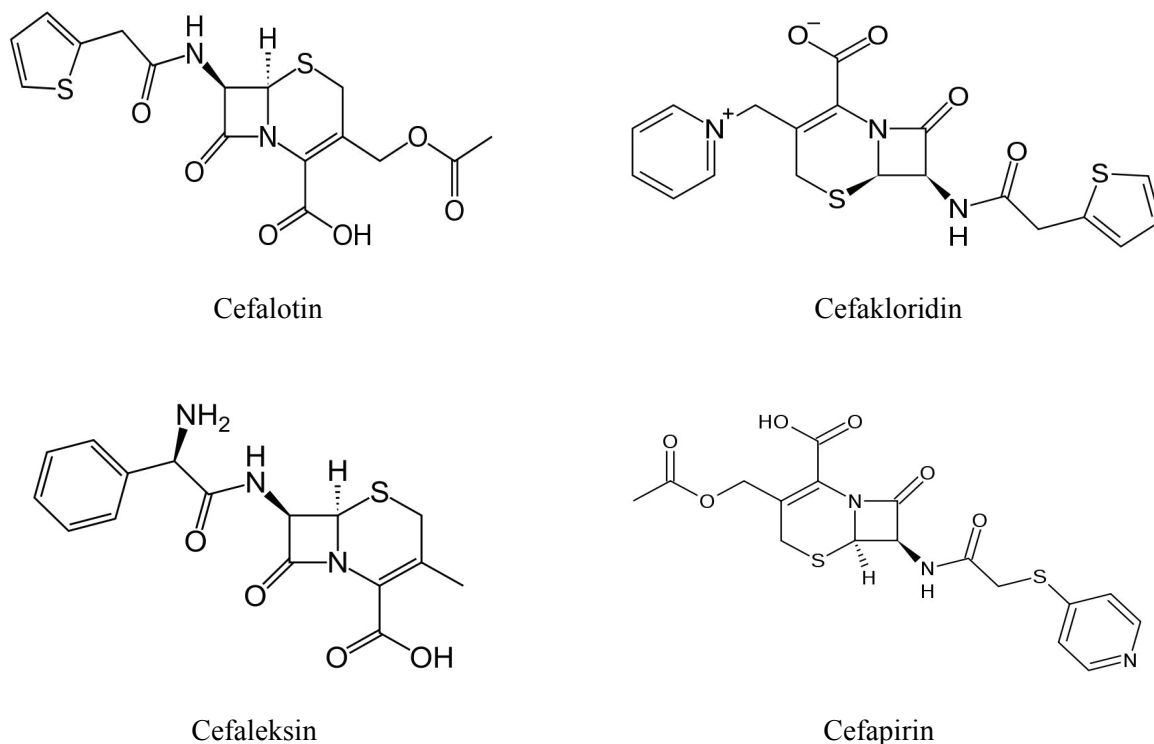
Fig. 3. Chemical structure of 7-aminocephalosporine acid (Graham, 1995)

Cefalosporinski antimikrobni lijekovi

Iz kulture plijesni aktinomiceta izolirana su tri cefalosporina: P, N i C. Cefalosporin C je derivat 7-amino-cefalosporinske kiseline koja sadrži jedan dihidrotiazinski i jedan β -laktamski prsten (Slika 3) (Kunec-Vajić i sur., 1993). Danas se proizvode polusintetski derivati 7-amino-cefalosporinske kiseline dodavanjem bočnog lanca na jezgri cefalosporina C i to na mjestu 7-aminoacilnog ogranka R^2 (cefalotin) ili 3-acetoksimetilnog ogranka R^1 (cefaleksin, cefaloridin (Slika 4)). Cefalosporinske analoge nije kao penicilinske moguće proizvesti procesom fermentacije već se 7-aminocefalosporinska kiselina isključivo proizvodi kemijskom hidrolizom cefalosporina C (Graham, 1995). Cefalosporinski antimikrobni lijekovi su topljivi u vodi i razmjerno stabilni u kiselini. Kemijska svojstva su slična svojstvima penicilina, ali cefalosporini su stabilniji na temperaturne promjene i

promjene pH sredine. Općenito je njihova aktivnost slabija u usporedbi s penicilinima, ali imaju širi raspon djelovanja. Osjetljivost na β -laktamaze im je različita (Rang, 2006).

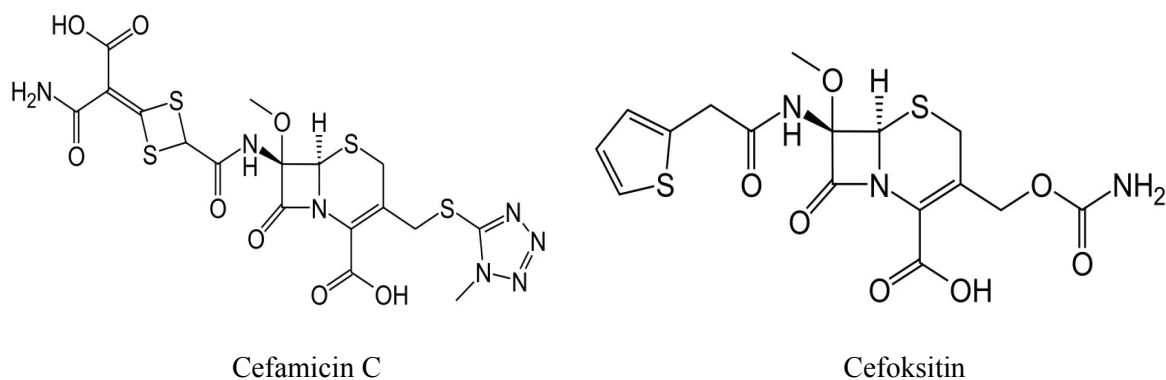
Cefalosporin C je zbog polarnosti bočnog lanca teško izolirati. Njegov potencijal je čak sto puta slabiji od penicilina G, ali je njegova antibakterijska aktivnost ujednačeno usmjerena prema gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama. Relativno je stabilan na kiselinsku hidrolizu, ne apsorbira se pri oralnoj primjeni i pokazuje veću stabilnost prema β -laktamazi od penicilina G (Graham, 1995).



Slika 4. Kemijska struktura cefalosporinskih antimikrobnih lijekova (Graham, 1995)
Fig. 4. Chemical structure of cephalosporine antimicrobial drugs (Graham, 1995)

Cefamicini su cefalosporinski antimikrobni lijekovi dobiveni supstitucijom metoksilnom skupinom na 7 ugljikovom atomu β -laktamskog prstena (Rang, 2006). Roditeljska molekula cefamicin C izolirana je iz kulture bakterije *Streptomyces clavuligerus* i prvi je β -laktam izoliran iz bakterijskog izvora (Öster i sur., 2006). Natrijeve soli cefamicina su dobro topljive u vodi, metanolu i etanolu i netopljive u ostalim organskim otapalima. Cefamicini su stabilni

pri pH 2-8 (Weinstein i Wagman, 1978). Modifikacijom bočnog lanca cefamicina C dobiven je cefoksitin koji, zahvaljujući izrazitoj otpornosti na djelovanje β -laktamaza, pokazuje najširi spektar aktivnosti od svih cefalosporina (Slika 5). Smatra se da je povećana otpornost rezultat steričkih smetnji od dodatne metoksilne skupine. Cefoksitin je stabilan na hidrolitičke enzime i slabo se apsorbira u želucu pa se primjenjuje venozno (Graham, 1995).



Slika 5. Kemijska struktura cefamicina C i cefoksitina (Graham, 1995)
Fig. 5. Chemical structure of cefamicine and cefoxytine (Graham, 1995)

Mehanizam djelovanja β -laktama i primjena

Penicilinski antimikrobni lijekovi

Penicilini u terapijskim koncentracijama djeluju baktericidno inhibirajući sintezu stanične stijenke bakterija. Nakon vezanja za specifične proteinske receptore bakterija (penicillin binding proteins, PBP), penicilin inhibira transpeptidacijski enzim koji poprečno povezuje peptidne lance pričvršćene na peptidoglikansku okosnicu. Na kraju, penicilin inaktivira inhibitore enzima autolize u staničnoj stijenci što uzrokuje raspadanje bakterije (Rang, 2006).

Penicilini su iznimno važni za antibakterijsku kemoterapiju, često u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima. Penicilini s užim spektrom djelovanja (penicilin G i V) djeluju dobro na gram-pozitivne bakterije (streptokoke, pneumokoke, bacil antraksa, klostridije, listerije). Djeluju i na gram-negativne koke (meningokok i gonokok) i gram-negativne anaerobe te na spirohete i aktinomicete. Penicilini s proširenim spektrom djelovanja (aminopenicilini; ampicilin, amoksicilin) djeluju protiv nekih gram-negativnih bakterija na koje penicilin G ne djeluje. To su *Salmonella*, *Shigella* i *Haemophilus*, pa *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*. Spektar je širi i prema gram-pozitivnim uzročnicima enterokokima i listerijama. Predstavnici aminopenicilinske skupine uspješno se primjenjuju u infekcija gornjeg respiratornog trakta (sinusitis, akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa i epiglotitis), urinarnog trakta, kod akutnog bakterijskog meningitisa kod djece te kod infekcija salmonelama. U liječenju infekcija uzrokovanih stafilokokima (prvenstveno *S. aureus*) važna je otpornost antimikrobnih lijekova na β -laktamaze. U tu svrhu razvijeni su penicilini otporni na djelovanje stafilokokne β -laktamaze: meticilin, oksacilin, kloksacilin i dikloksacilin (Kunec-Vajić i sur., 1993).

Cefalosporinski antimikrobni lijekovi

Cefalosporinski antimikrobni lijekovi poput penicilina djeluju na izgradnju stanične stijenke bakterija, ali rijetko podliježu razgradnji β -laktamazama. Obično se primjenjuju kao zamjena za peniciline u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama te u profilaksi pri kirurškim zahvatima (Šeol i sur., 2010).

Cefalosporini se dijele u četiri skupine. Prvoj generaciji pripadaju cefapirin, cefalotin, cefazolin, cefaleksin i cefadroksil koji su djelotvorni protiv gram-pozitivnih koka, a djeluju i na *E. Coli*,

Klebsiella pneumoniae i *Proteus mirabilis*. Najčešće se koriste u liječenju dermatitisa uzrokovanog vrstama *Staphylococcus*. Cefaleksin i cefazolin se prvenstveno koriste kod kožnih infekcija uzrokovanih streptokokima i bakterijom *Staphylococcus aureus* te za bakterijski endokarditis uzrokovan vrstama *Streptococcus viridans* i *Staphylococcus aureus*. U drugu generaciju svrstavaju se cefuroksim, cefoksitin, cefaklor i cefamandol koji se primjenjuju protiv istih uzročnika kao predstavnici prve generacije, ali su otporniji na β -laktamaze gram-negativnih uzročnika. Treću generaciju čine cefoperazon, cefotaksim, ceftazidim i cefriakson koji su manje aktivni protiv gram-pozitivnih koka od predstavnika prve generacije, ali su mnogo djelotvorniji protiv gram-negativnih uzročnika. Najvažnija je indikacija liječenje meningitisa uzrokovanog gram-negativnim aerobima (Kunec-Vajić i sur., 1993). Cefalosporini četvrte generacije su cefepim, cefpirom i cefkvinom, a karakterizira ih otpornost na stafilokoknu β -laktamazu, β -laktamaze enterobakterija i vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Šeol i sur., 2010). Cefamicini su djelotvorni protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija uključujući *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* i *Alcaligenes faecalis*. Prema *Pseudomonas aeruginosa* pokazuju slabu aktivnost (Weinstein i Wagman, 1978; Graham, 1995).

Biosinteza β -laktama

Klasični β -laktamski antimikrobni lijekovi (penicilini i cefalosporini) su izolirani iz sojeva različitih plijesni. Dugo vremena se mislilo da prokarioti ne mogu sintetizirati ove strukture. Danas se zna da aktinomicete sintetiziraju penicilin N, cefalosporin C i cefamicine te da čak i neke gram-negativne zemljišne bakterije sintetiziraju molekule nekih cefalosporina.

Prva dva koraka biosinteze penicilina i cefalosporina su identična. Svi prirodni penicilini i cefalosporini koje proizvode eukariotski ili prokariotski mikroorganizmi se sintetiziraju iz tri aminokiseline: L- α -aminoadipinske kiseline (L- α -AAA), L-cisteina i L-valina. Kod plijesni L- α -AAA potječe iz specifičnog amino adipatskog puta sinteze lizina. Također, može nastati kataboličkom razgradnjom lizina iako ovaj put još nije sasvim razjašnjen. U prvoj reakciji biosinteze prekursori aminokiselina se kondenziraju u tripeptid δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin (ACV). Ovu reakciju katalizira enzim δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin sintetaza (ACV sintetaza). Iduća reakcija je

oksidativno zatvaranje prstena linearnog tripeptida u biciklički prsten, četveročlani β -laktamski prsten pridružen peteročlanom tiazolidinskom prstenu. Ciklizacija uključuje dva desaturacijska stupnja u kojima je kisik akceptor vodika, a Fe^{2+} je kofaktor. Ovu reakciju katalizira enzim izopenicilin N sintetaza, a nastali spoj izopenicilin N (IPN) posjeduje slabu antibakterijsku aktivnost te je stoga prvi bioaktivni međuprodukt biosinteze penicilina i cefalosporina. U trećem, završnom koraku biosinteze penicilina, djelovanjem enzima acil koenzim A, izopenicilin N aciltransferaze hidrofilni L- α -AAA lanac izopenicilina N zamjenjuje se hidrofobnom acilnom skupinom. Biosintetski put mnogih β -laktama se odvodi iz metaboličkog puta biosinteze penicilina. Ako se u kultivacijsku sredinu dobavlja feniloctena ili fenoksiocetena kiselina sinteza se direktno preusmjerava prema proizvodnji penicilina G i V. Proizvodnja hidrofobnih penicilina otkrivena je samo u plijesnima, osobito u *P. Chrysogenum* i *A. Nidulans*, dok hidrofilne cefalosporine proizvode i plijesni i bakterije, *A. chrysogenum* i *Streptomyces clavuligerus*.

Prvi korak biosinteze cefalosporina je sinteza penicilina N reakcijom izomerizacije L- α -AAA bočnog lanca izopenicilina N u D-enantiomer. Ova reakcija je katalizirana sustavom izopenicilin N epimeraza. Penicilin N je prekursor antimikrobnih lijekova koji sadrže cefemsku jezgru (cefalosporini i cefamicini). Penicilin N se djelovanjem deacetoksicefalosporin C sintetaze prevodi u deacetoksicefalosporin C (DAOC). Ova korak uključuje oksidativno otvaranje tiazolidinskog prstena i zatvaranje u šesteročlani dihidrotiazinski prsten koji je karakteristika svih cefalosporina. Mehanizam ove reakcije je vrlo sličan onom pri formiranju izopenicilina N i također zahtijeva kisik kao kosupstrat i Fe^{2+} kao kofaktor. Slijedeći stupanj je oksidacija i hidroksilacija 3- metilne skupine deacetoksicefalosporina C u deacetylcefalosporin C (DAC); posljednji zajednički metabolit u biosintezi cefalosporina i cefamicina. Ovu reakciju katalizira enzim DAOC sintetaza/DAC hidroksilaza koji je pronađen u *Streptomyces clavuligerus*. U posljednjem koraku biosinteze cefalosporina C, acetilni ostatak acetil koenzima A se djelovanjem enzima acetil koenzim A deacetylcefalosporin C acetyltransferaze prebacuje na hidroksilnu skupinu deacetylcefalosporina C (Brakhage i sur., 2005).

Biosinteza cefamicina pretežito je istraživana na *S. clavuligerus*, ali detaljan slijed reakcija koje dovode do 7- α -metoksilacije nije dovoljno razjašnjen. U prvom stupnju deacetylcefalosporin C se djelovanjem enzima 3-hidroksimetilcef-3-em O-karbamoiltransferaze karbamoilira na C-3 u O-karbamoildeacetylcefalosporin

C (OCDAC). Potom se djelovanjem OCDAC hidroksilaze OCDAC hidroksilira na C-7 u 7- α -hidroksi-OCDAC. U posljednjem koraku biosinteze cefamicina hidroksilna skupina na C-7 se djelovanjem cefamicin C sintetaze metilira metilnom skupinom metionina u cefamicin C (7-metoksicefalosporin) (Öster i sur., 2006; Brakhage i sur., 2005).

Postupci određivanja β -laktama

Antimikrobni lijekovi su kemoterapeutici koji imaju široku primjenu u humanoj, veterinarskoj i stočarskoj praksi. Kako je već navedeno, β -laktami se široko koriste u veterinarskoj praksi kao promotori rasta, kemoterapeutici te u terapiji životinja (European Medicines Agency, 2008). Primjena antibakterijskih lijekova u životinja koje se koriste kao hrana može rezultirati ostatcima tih lijekova u mesu i mesnim prerađevinama te mlijeku i jajima te je njihovo određivanje nužno. Obzirom da se izrazito puno koriste u tretmanu mastitisa β -laktami su najčešće utvrđeni antimikrobni lijekovi u mlijeku (Msagati i Nindi, 2007; Bilandžić i sur., 2011).

Unošenje antimikrobnih lijekova u ljudski organizam hranom, osobito je opasno zbog njihove direktne toksičnosti odnosno kancerogenosti, utjecaja na sastav crijevne mikroflore, mogućih alergijskih reakcija u senzibiliziranih ljudi, te pojave otpornosti pojedinih patogenih mikroorganizama. U svrhu zaštite zdravlja potrošača i osiguranja kvalitetne proizvodnje Europska Unija je Direktivom (European Commission, 2010) utvrdila najveće dopuštene količine (NDK) ostataka antimikrobnih lijekova u hrani životinjskog podrijetla. U skladu s time u Hrvatskoj su ostatci veterinarskih lijekova određeni Pravilnikom o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (N. N. 21/2011). U Tablici 1 prikazane su vrijednosti NDK vrijednosti ostatka pojedinih β -laktama u hrani životinjskog porijekla.

Tablica 1. Pregled najvećih dopuštenih količina (NDK, $\mu\text{g}/\text{kg}$) ostataka β -laktama prema Pravilniku o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (N. N. 21/2011)**Table 1.** Maximal residual limits (MRL, $\mu\text{g}/\text{kg}$) of β -lactames due to Ordinance on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Official Gazette 21/11)

β -laktami	Životinjska vrsta	Mišić	Jetra	Bubreg	Masno tkivo	Mlijeko
<i>PENICILINI</i>						
Benzilpenicilin	sve	50	50	50	50	4
Ampicilin	sve	50	50	50	50	4
Amoksisicilin	sve	50	50	50	50	4
Oksacilin	sve	300	300	300	300	30
Kloksacilin	sve	300	300	300	300	30
Dikloksacilin	sve	300	300	300	300	30
<i>CEFALOSPORINI</i>						
Cefaleksin	goveda	200	200	1000	200	100
Cefapirin	goveda	50		100	50	60
Cefazolin	goveda, ovce, koze	-	-	-	-	50
Ceftiofur	sve	1000	2000	6000	2000	100
Cefalonij	goveda	-	-	-	-	100
Cefoperazon	govedo					50
Cefacetril	govedo					125
Cefkvinom	govedo	50	100	200	50	20

Metodologija određivanja β -laktama u biološkim tkivima započinje kao i kod brojnih antimikrobnih lijekova, ekstrakcijom puferima na bazi soli. Vodeni ekstrakt se koncentrira i pročišćuje najčešće na kolonama za kruto faznu ekstrakciju (SPE). Prisutnost slobodne karboksilne skupine čini β -laktame snažnim organskim kiselinama, osim amoksisicilina i ampicilina koji zbog amino skupina imaju amfoterna svojstva, te se kao izrazito polarne komponente teško ekstrahiraju organskim otapalima (Stolker i sur., 2007).

Metode utvrđivanja ostataka antibakterijskih lijekova mogu biti kvalitativne (mikrobiološki i imunoenzimatski testovi) te kvantitativne (pojedini imunoenzimatski testovi, plinska i tekućinska kromatografija) (Mulalić i sur., 2006). U svrhu određivanja ostataka β -laktama u hrani životinjskog podrijetla odnosno u svrhu screeninga i utvrđivanja sumnjivih uzoraka primijenjuju se mikrobiološke metode kao što su STAR protokol, Premi i Delvo test te NAT test (Gaudin i sur., 2004; Stead i sur., 2008; Pikkmaat i sur., 2009). Identifikacija i detekcija, odnosno kvanifikacija β -laktama moguća je primjenom tekućinske kromatografije s UV detekcijom ili fluorescentnom detekcijom nakon postupka derivatizacije. Međutim, većina analitičkih metoda razvijenih za kvantitativnu analizu β -laktama u hrani danas se temelji na tekućinskoj kromatografiji spektrometrije masa (LC-MS), tekućinskoj kromatografiji tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) ili tekućinskoj kromatografiji spektrometrije masa u stupici iona (LC-IT-MS/MS) (Di Corcia i

Nazzari, 2002; Balizs i Hewitt, 2003; Stolker i sur., 2007). Kod tandemске spektrometrije masa ekstrakcija analita temelji se na tekućinsko faznoj ekstrakciji, npr. s acetonitrilom, nakon čega slijedi ultrafiltracija, dok se kod jednostavne MS detekcije koriste različiti koraci tekućinsko-tekućinske ekstrakcije poput dodatka acetonitrila kako bi se spriječilo vezanje analita na proteine, a potom ekstrakcija s pogodnim otapalom (Blanchflower i sur., 1994).

Na temelju objavljenih studija, najbolji učinak kromatografskog odjeljivanja i najbolja osjetljivost masenog spektrometra postiže se dodatkom mravlje kiseline u mobilnu fazu. Da bi se primjenom tandemске spektrometrije masa postigla najveća osjetljivost potrebno je odabrati točno određeni ion za identifikaciju, dok se primjenom masene spektrometrije u stupici iona (LC-IT-MS) omogućuje dobivanje punog masenog spektra pri najvećoj osjetljivosti instrumenta. Holstege i sur. (2002.) opisali su LC-IT-MS/MS metodu za određivanje 7 β -laktama u mlijeku, međutim zbog primjene kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI) metoda se nije pokazala dovoljno osjetljivom iako je znatno smanjen matriks efekt.

Kod primjene tekućinske kromatografije spektrometrije masa s ionizacijom elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada (LC-ESI(+))MS/MS postiže se intenzivniji signal i veći raspon fragmentacije molekula nego kod primjene negativnog. Stoga se većina β -laktama određuje ovim načinom rada, osim kod analize ampicilina i

amoksicilina kada se zbog amfoternog karaktera ovih spojeva primjenjuje ESI negativan mod (Becker i sur., 2003; Blanchflower i sur., 1994). Dalji korak u razvoju je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) koja se danas se primjenjuje za razvoj multirezidualnih metoda. Ova tehnika se u visokorazvijenim analitičkim laboratorijima Europske unije koristi za određivanje β -laktama i drugih porodica antimikrobnih lijekova te omogućuje poboljšane kromatografskog razdvajanja molekula odnosno određivanje većeg broja analita s visokom osjetljivošću (Stolker i sur., 2008).

Zaključak

Beta-laktamski antimikrobni lijekovi penicilini, cefalosporini i monobaktamati se zbog snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti često primjenjuju u humanoj i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija. U terapijskim koncentracijama djeluju baktericidno inhibirajući sintezu stanične stijenke bakterija. Fizikalno-kemijska svojstva beta-laktama mogu se mijenjati supstitucijom vodika u karboksilnoj skupini penicilina, odnosno modifikacijom bočnog lanca cefalosporina. Proizvodnjom polusintetskih beta-laktama postignuta su poboljšanja prirodnih inicijalnih molekula penicilina G i cefalosporina C te povećana otpornost na djelovanje β -laktamaze i proširenje spektra djelovanja. Tako je modifikacijom bočnog lanca cefamicina C dobiven cefoksitin koji, zahvaljujući izrazitoj otpornosti na djelovanje β -laktamaza, pokazuje najširi spektar aktivnosti od svih cefalosporina. Penicilini su važni za antibakterijsku kemoterapiju, i često se koriste u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima. Cefalosporini se obično primjenjuju kao zamjena za peniciline u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama te u profilaksi pri kirurškim zahvatima. Ostaci beta-laktama mogu zaostati u hrani životinjskog podrijetla, odnosno mesu i mesnim prerađevinama te mlijeku i jajima. Unošenje u ljudski organizam može imati toksične učinke, odnosno utjecaj na sastav crijevne mikroflore, moguće alergijske reakcije, te pojavu otpornosti prema pojedinim patogenim mikroorganizmima. Obzirom da se puno koriste u tretmanu mastitisa najčešće su utvrđeni antimikrobni lijekovi u mlijeku. Stoga je njihovo određivanje u hrani životinjskog podrijetla nužno i provodi se primjenom mikrobioloških metoda u svrhu utvrđivanja sumnjivih uzoraka, a identifikacija i kvantifikacija najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom tandemskom spektrometrijom masa.

Literatura

- Balitz, G., Hewitt, G. (2003): Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 492, 105-131.
- Bilandžić, N., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Scortichini, G., Annunziata, L., Brstilo, M., Rudan, N. (2011): Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia, *Food Contr.* 22, 1941-1948.
- Becker, M., Zittlau, E., Petz, M. (2003): Quantitative determination of ceftiofur-related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization, *Eur. Food Res. Technol.* 217, 449-456.
- Blanchflower, W.J., Hewitt, S.A., Kennedy, D.G. (1994): Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Analyst* 119, 2595-2601.
- Brakhage, A.A., Al-Abdallah, Q., Tüncher, A., Spröte, P. (2005): Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors, *Phytochemistry* 66, 1200-1210.
- Di Corcia, A., Nazzari, M. (2002): Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products, *J. Chromatogr. A* 974, 53-89.
- European Commission (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Commun.* L15, 1-72.
- European Medicines Agency (2008): Penicillins, summary report. Committee for veterinary medicinal products, EMEA, Revision 1, London.
- Fagerquist, C.K., Lightfield, A.R. (2003): Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 660-671.
- Gamba, V., Dusi, G. (2003): Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization, *Anal. Chim. Acta* 483, 69-72.
- Gaudin, V., Maris, P., Fuselier, R., Ribouchon, J.-L., Cadieu, N., Rault, A. (2004): Validation of a microbiological method: The STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk, *Food Addit. Contam.* 21, 422-433.
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends Anal. Chem.* 24, 704-733.
- Graham, L.P. (1995): An Introduction to Medicinal Chemistry Department of Chemistry, Paisley University, Oxford University Press, Oxford.
- Holstege, D.M., Puschner, S., Whitehead, G., Galey, F.D. (2002): Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS, *J. Agric. Food. Chem.* 50, 406-411.

- Kunec-Vajić, E., Bulat, M., Gjuriš, V. (1993): Medicinska farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada.
- Laurence R.D., Bennett, P.N. (1988): Klinička farmakologija. U: Znanstvene osnove praktične primjene lijekova s komentarom Jugoslavenske materije medik, Vrhovac B., (ured.), 3. izd., Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb.
- Mšagati, T.A.M., Nindi, M.M. (2007): Determination of β -lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry, *Food Chem.* 100, 836-844.
- Mulalić, J., Kozačinski, L., Benussi Skukan, A., Filipović, I., Runje, M. (2006): Metode utvrđivanja ostataka antibiotika i sulfonamida u mesu, *Meso* 8, 37-42.
- Öster, L.M., Lester, D.R., van Schelting, T.A., Svenda, M., van Lun, M., Génèreux, C., Andersson, I. (2006): Insights into cephamycin biosynthesis: the crystal structure of CmcI from *Streptomyces clavuligerus*, *J. Mol. Biol.* 358, 546-58.
- Pikkemaat, M.G., Rapallini, M.L.B.A., Oostra-van Dijk, S., Elferink, J.W.A. (2009): Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples, *Anal. Chim. Acta* 637, 298-304.
- Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine broj 21/2011).
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (2006): Farmakologija. Churchill Livingstone, Urednik hrvatskog izdanja Geber J. Golden, Tehnička knjiga, Zagreb.
- Stead, S.L., Ashwin, H., Richmond, S.F., Sharman, M., Langeveld, P.C., Barendse, J.P. (2008): Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk, *Internat. Dairy J.* 18, 3-11.
- Stolker, A.A.M., Dema, T., Nielen, M.W.F. (2007): Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents, *Trends Anal. Chem.* 26, 967-979.
- Stolker, A.A.M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J.J.P., Peters, R.J.B., Van Rhijn, J.A., Nielen, M.W.F. (2008): Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2309-2322.
- Strohl, W.R. (1997): Biotechnology of antibiotics, New York: Marcel Dekker, Inc.
- Šeol, B., Matanović, K., Terzić, S. (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Herak-Perković, V. (ur.), Zagreb, HR, Medicinska naklada, str.45-49.
- Walsh, C. (2003): Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington DC, USA: ASM Press.
- Weinstein, M.J., Wagman, G.H. (1978): Antibiotics: isolation, separation and purification. U: Journal of chromatography library, vol. 15, Netherlands: Elsevier scientific publishing company.

Received: October 21, 2011

Accepted: December 15, 2011

Mechanism of activity, biosynthesis and identification of beta-lactam antimicrobial drugs

Božica Solomun Kolanović, Nina Bilandžić, Maja Đokić,
Ivana Varenina, Marija Sedak

Laboratory for Residue Control, Department of Veterinary Public Health, Croatian Veterinary Institute, Savska cesta 143, HR-10000 Zagreb, Croatia

review

Summary

Antimicrobial drugs are chemotherapeutics with a wide spectrum of use in human and veterinary medicine and livestock practice. Beta-lactams are the most widespread group of antimicrobial drugs and are most often used in human and veterinary medicine in the treatment of bacterial infections due to their powerful antimicrobial activity and very low toxicity. They are divided into the groups of penicillins, cephalosporins and monobactams. Penicillins are obtained from the filtrate of the mould cultures *Penicillium notatum* and *Penicillium chrysogenum*, while cephalosporins are obtained from the filtrate of the actinomycete cultures (*Cephalosporium acremonium*). Research has led to the discovery of active groups of 6-aminopenicillin acids, whose isolation has made it possible to produce semi-synthetic penicillins that have surpassed the limitations of natural penicillin G. The physico-chemical properties of the beta-lactams can be altered by substituting hydrogen in the carboxyl group of penicillins, i.e. in modifying the side chain of cephalosporin. This increases the resistance to the activity of β -lactamase and expands the spectrum of activity. Beta-lactams, in therapy concentrations, act as a bactericide by inhibiting the synthesis of bacterial cell walls. Penicillins are important for antibacterial chemotherapy, often in combination with other antimicrobial drugs. Cephalosporins are usually used as a replacement for penicillin in treating infections caused by gram-negative bacteria and in prophylaxis for surgery. The use of beta-lactams in animals used for food can result in the residues of these drugs in meat and meat products or milk and eggs. The introduction of antimicrobial drugs in the human body via food is particularly dangerous due to their direct toxicity or carcinogenicity, influences on the composition of the intestinal microflora, possible allergic reactions in sensitive people, and the appearance of resistance of individual pathogenic microorganisms, and therefore their determination is necessary. Considering that they are widely used in the treatment of mastitis, they are the most commonly determined antimicrobial drugs in milk. For the purpose of determining the residues of beta-lactams in food of animal origin, microbiological screening methods are used, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry is most often used for identification and quantification.

Keywords: beta-lactames, chemotherapeutics, synthesis, food of animal origin