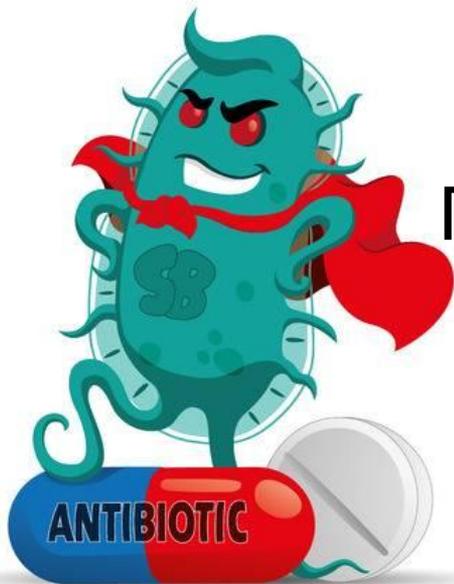


Механизм приобретенной резистентности микроорганизмов к антибиотикам – модификация мишени действия

Выполнила:

Павлова Анастасия Станиславовна
ординатор 1 года обучения, гр.1825



Томск – 2019 г.

Виды резистентности микроорганизмов к АБ

Природная

- характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика, недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации.
- природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется.

Приобретенная

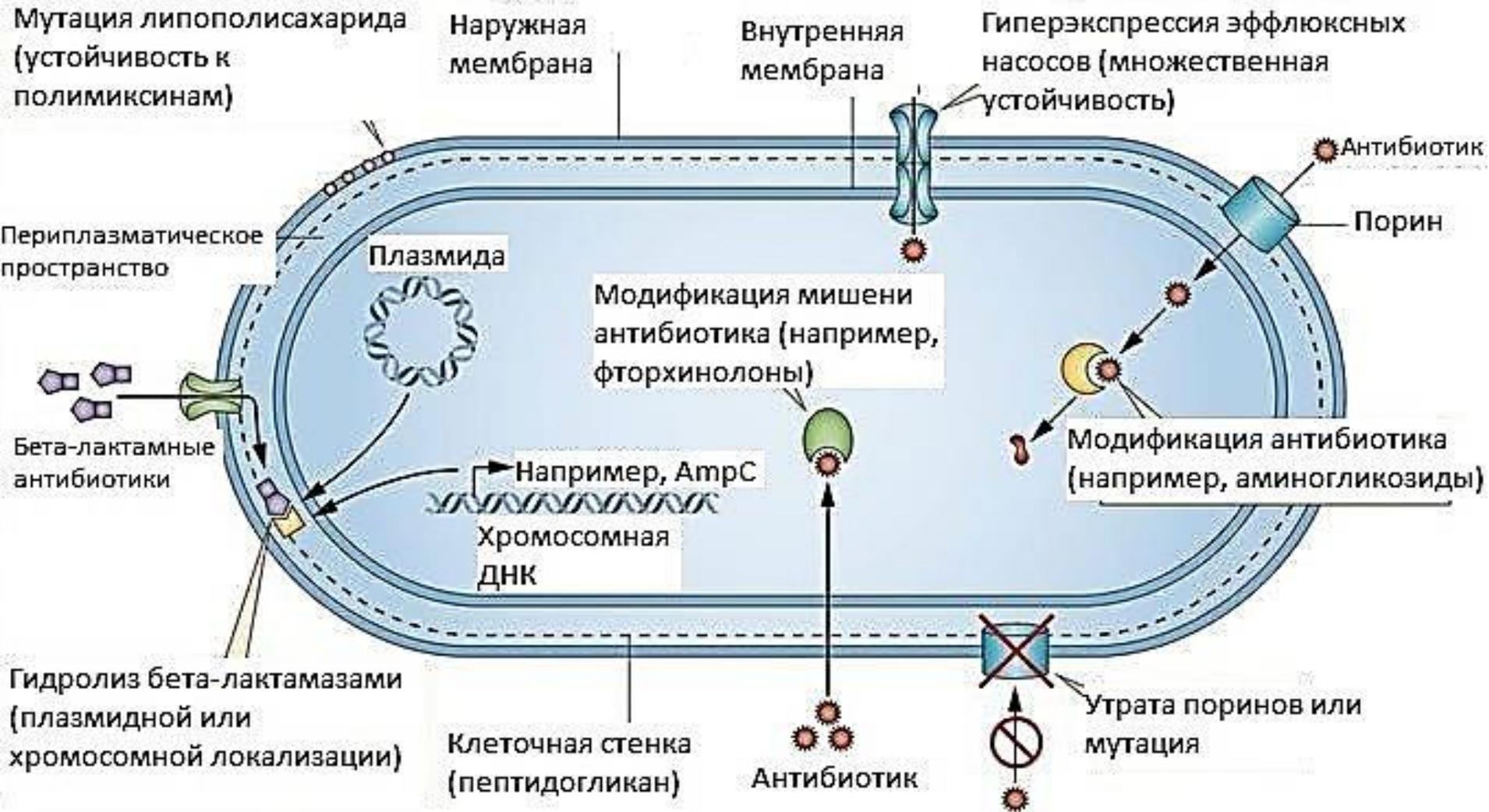
- свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях АБ, которые подавляют основную часть микробной популяции.
- формирование резистентности обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:

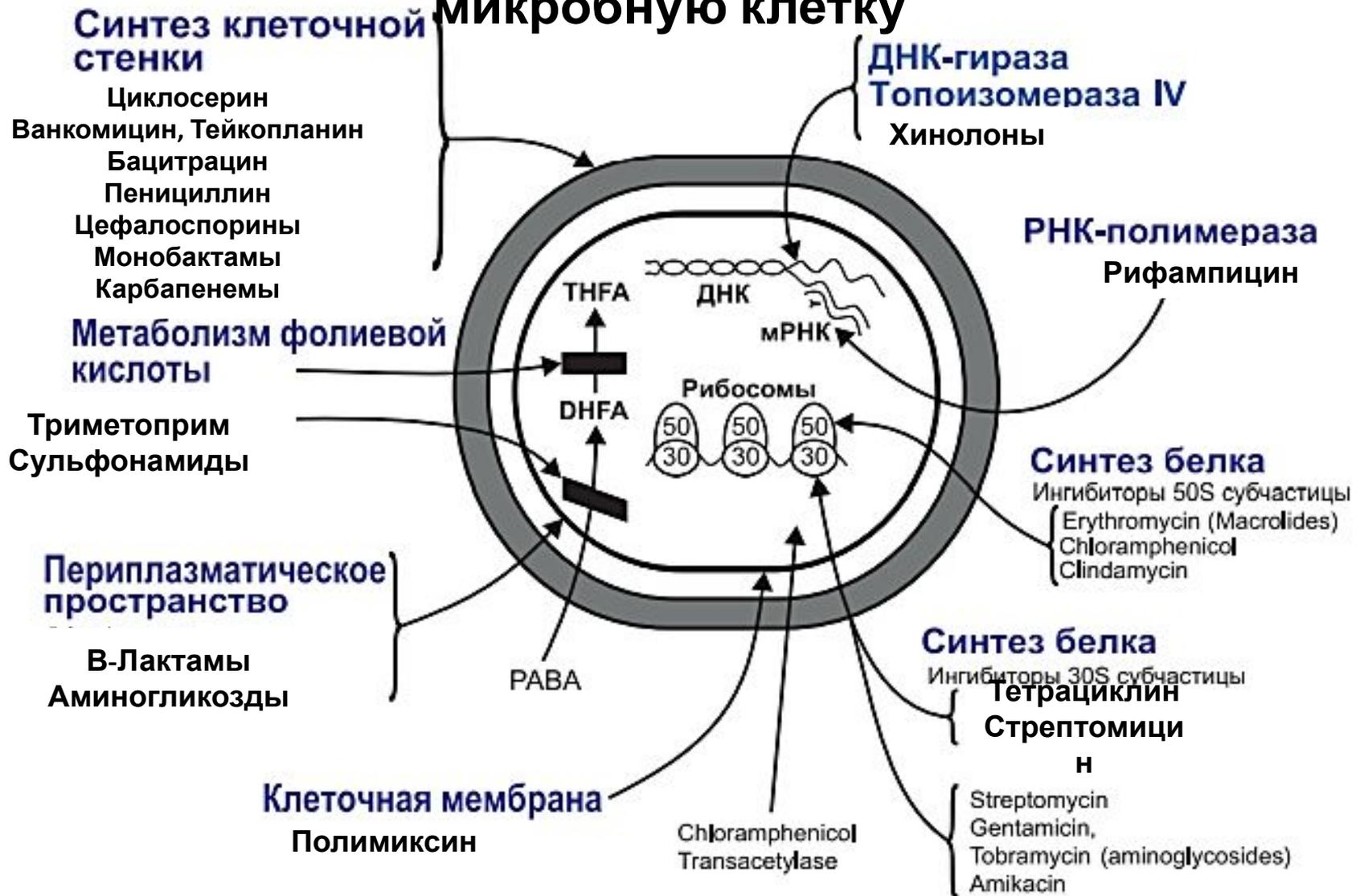
1. Модификация мишени действия.

Структура мишеней действия АБП подвержена изменчивости в результате спонтанных мутаций в кодирующих их генах или иных генетических событий. Часть таких изменений может привести к снижению (или утрате) способности мишени связываться с АБП.

Механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:



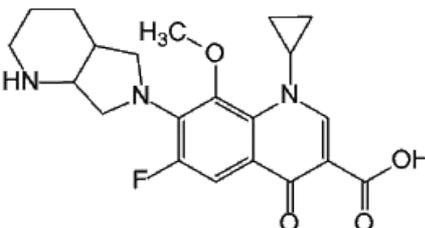
Основные механизмы воздействия АБ на микробную клетку

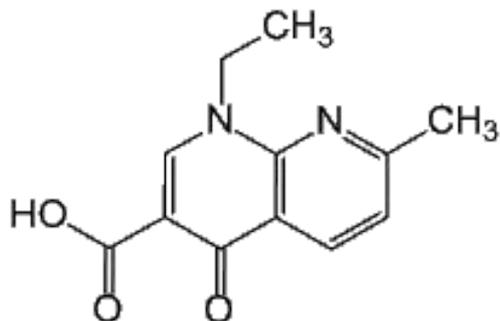


ТНФА, ДНФА — тетрагидро- и дигидрофолиевая кислоты, соответственно;
 РАВА — *p*-аминобензойная кислота

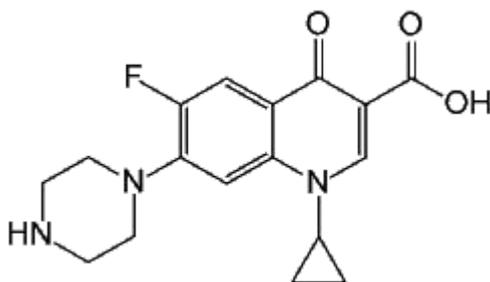
**Устойчивость к фторхинолонам
мишень действия: ДНК-гираза и
топоизомераза IV**

Классификация хинолонов

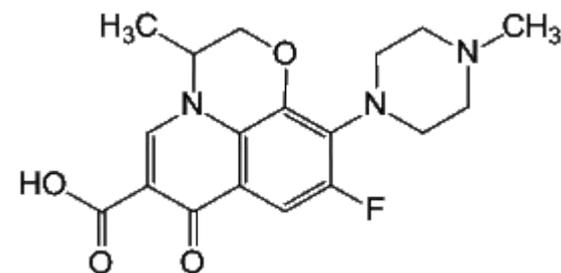
I поколение – нефторированные	II поколение – «грамотрицательные»	III поколение – «респираторные»	IV поколение – «респираторные +антианаэробные»
Налидиксовая к-та Оксолиновая к-та Пипемидовая к-та	Ципрофлоксацин Норфлоксацин Офлоксацин Пефлоксацин Ломефлоксацин	Спарфлоксацин Левофлоксацин	Моксифлоксацин 



**Налидиксовая
кислота**

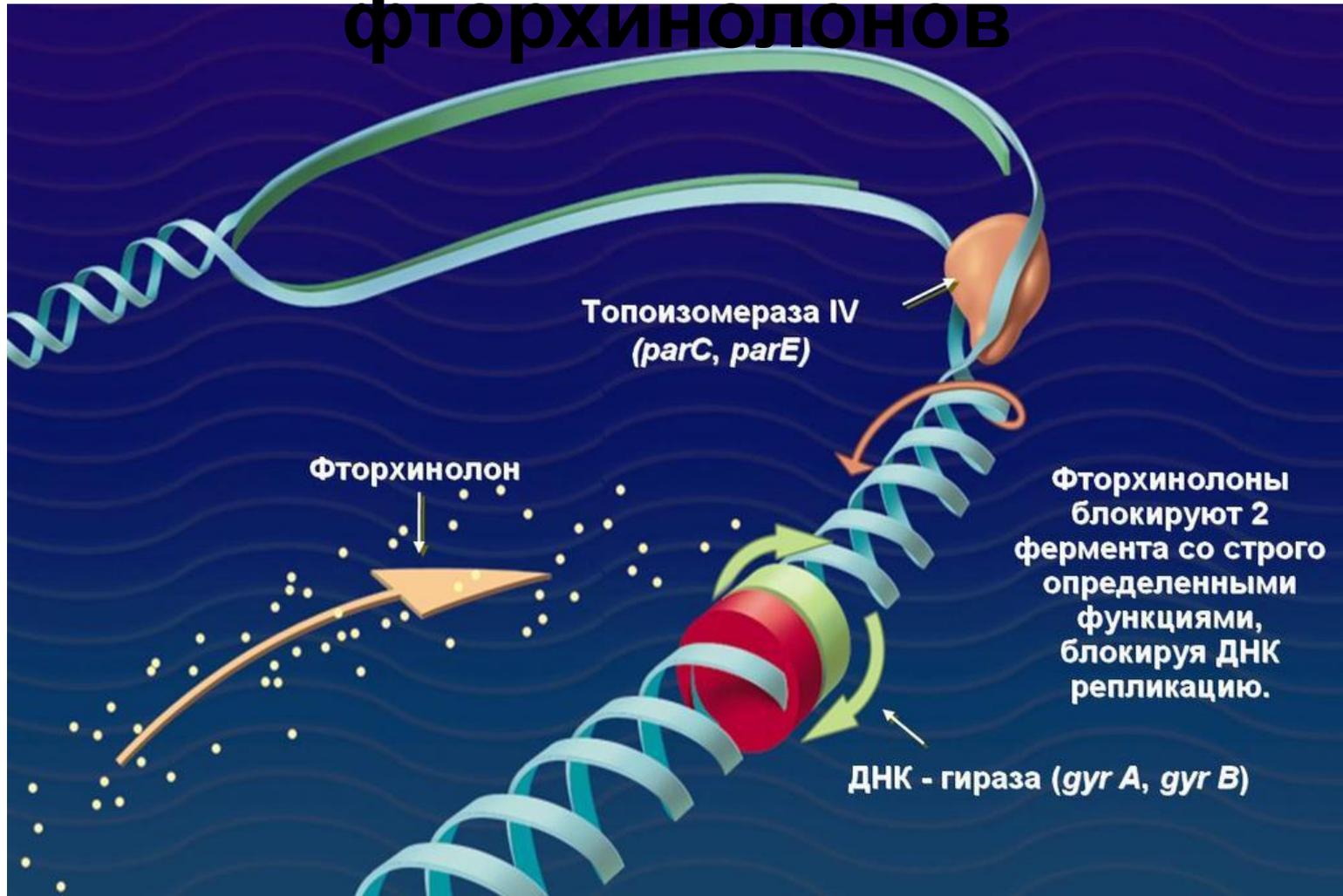


Ципрофлоксацин



Левофлксацин

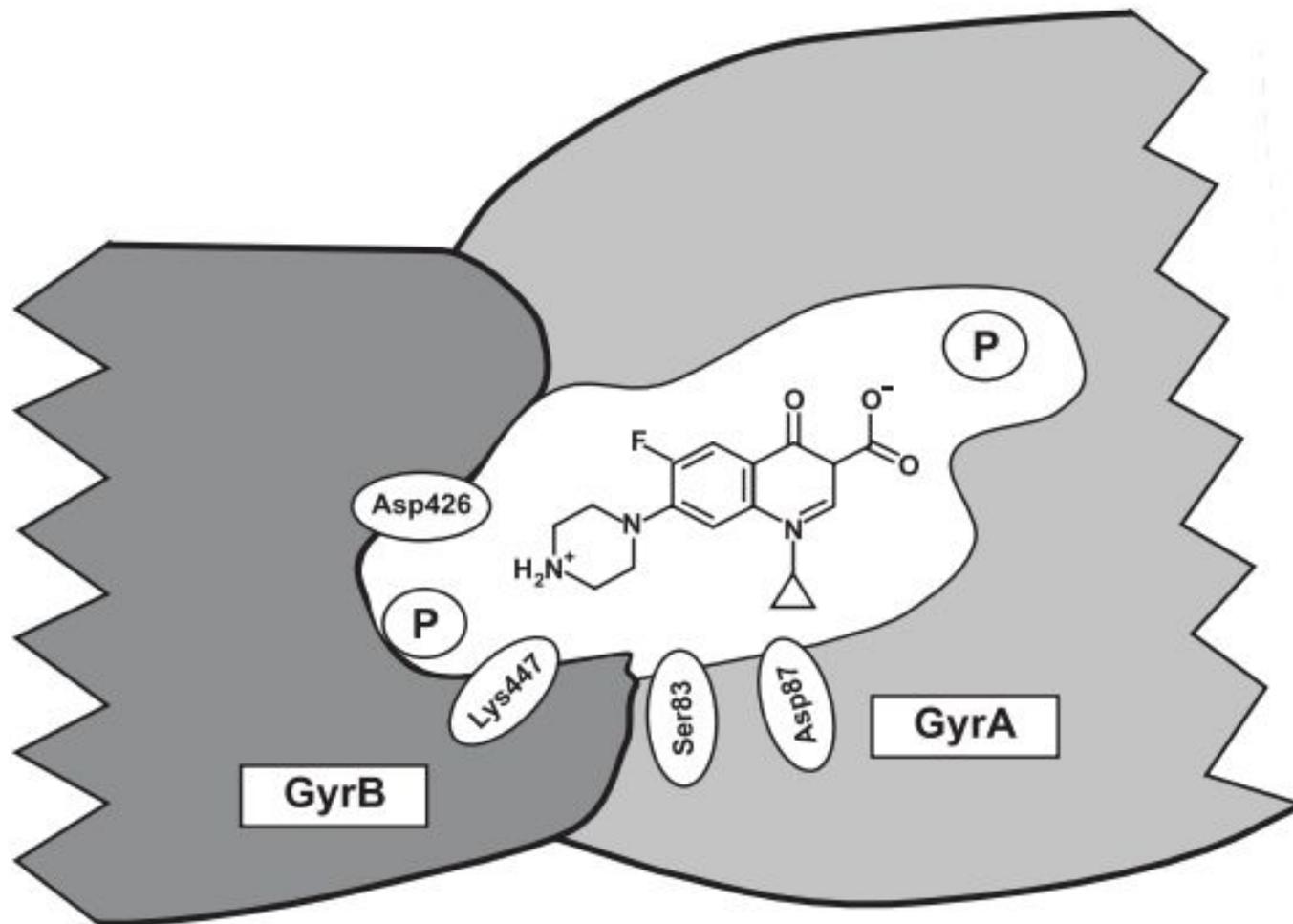
Механизм действия фторхинолонов



-ингибирование бактериальных ферментов ДНК-гиразы, топоизомераз II и IV, что приводит к нарушению репликации ДНК (бактерицидный эффект).

Хинолоновый карман в молекуле ДНК-гиразы.

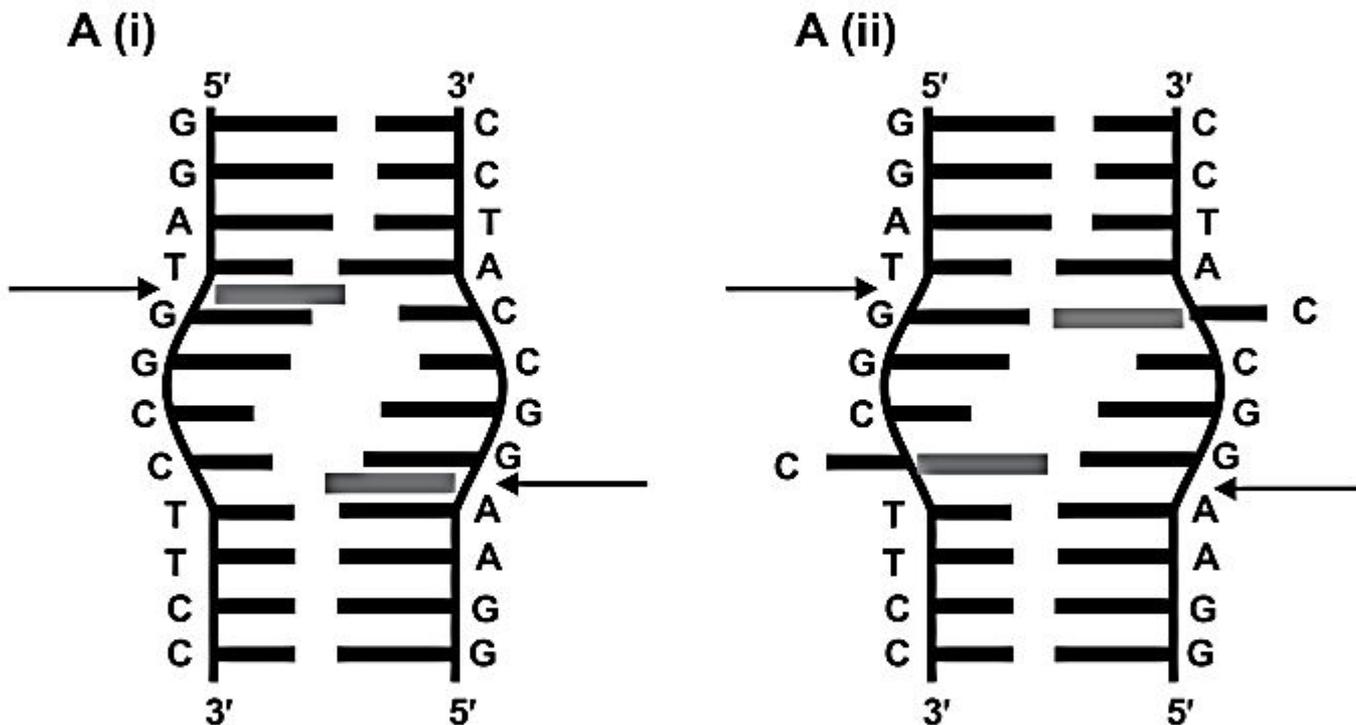
Выделены аминокислотные остатки в субъединицах А и В, критичные для взаимодействия с молекулой



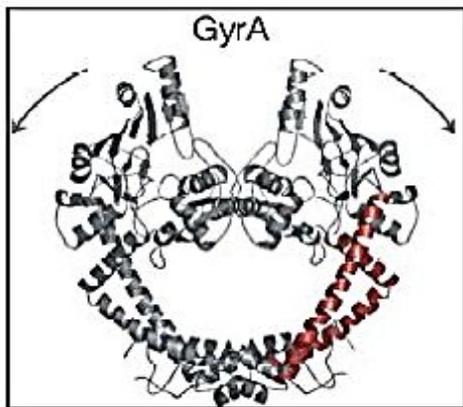
Взаимодействие ципрофлоксацина с молекулой ДНК, находящейся в активном центре фермента.

Участки разрыва двойной спирали отмечены стрелками. Препарат представлен в виде серых прямоугольников.

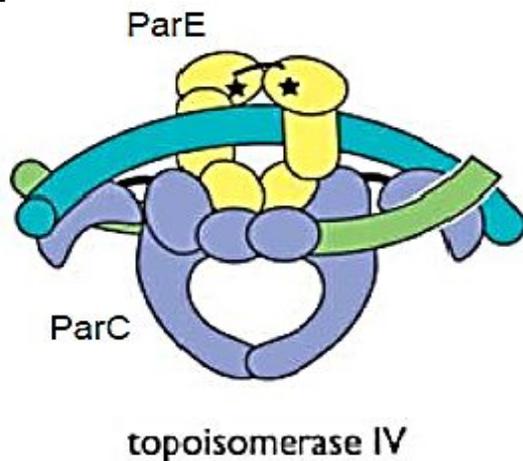
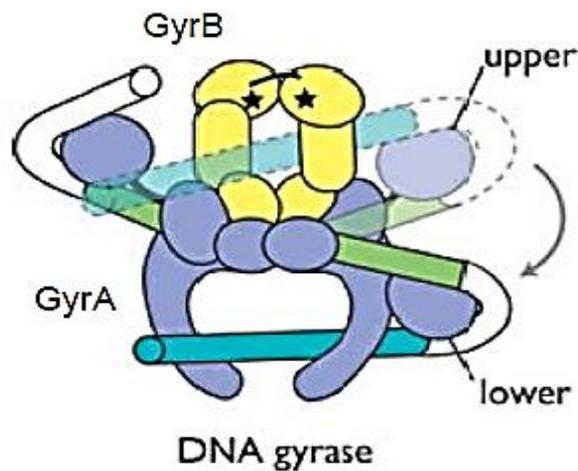
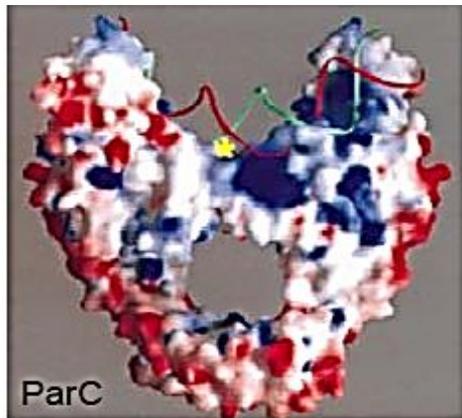
Предполагаемые варианты: А(i) – встраивание молекулы хинолона между нуклеотидами; А(ii) – вытеснение цитозина.



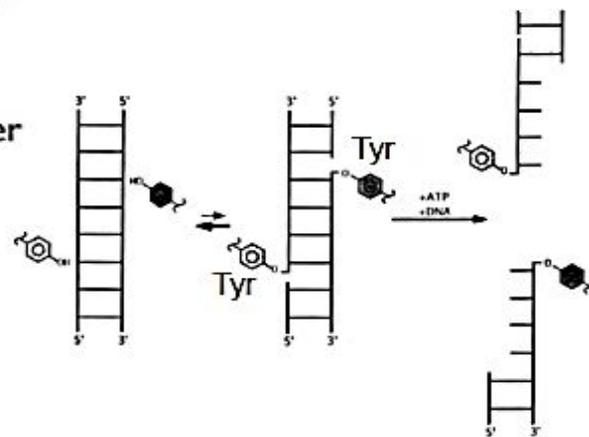
Строение ДНК-гиразы и топоизомеразы IV



Каждый из ферментов состоит из четырех субъединиц.

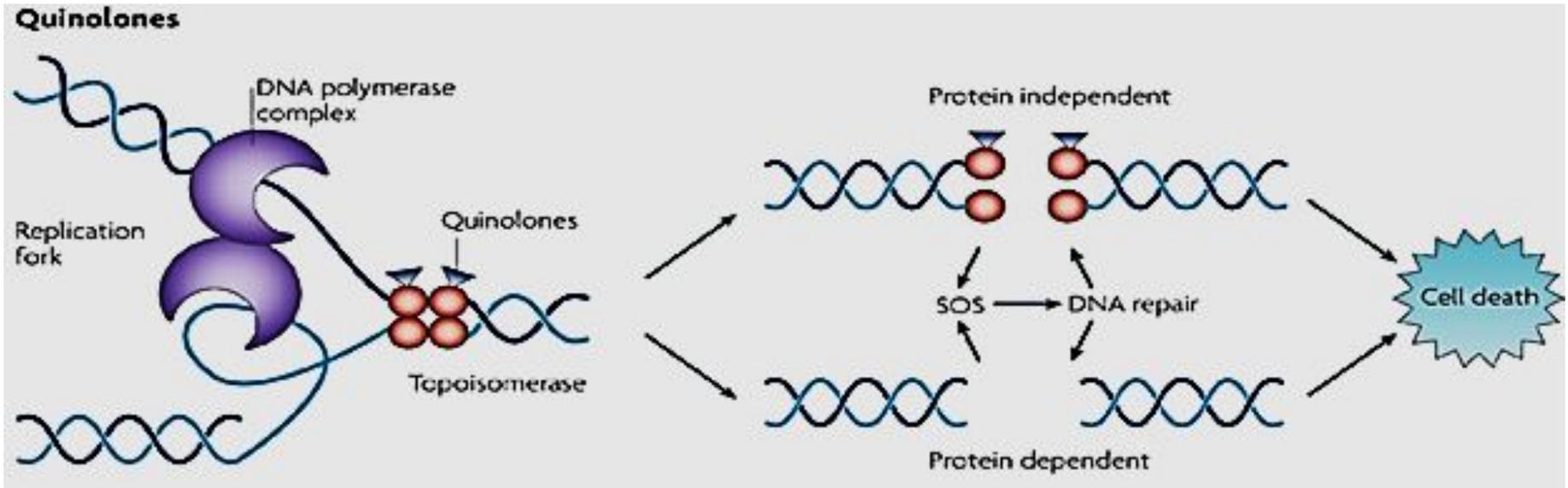


ДНК-гираза состоит из двух gyrA и двух gyrB субъединиц (соответствующие гены gyrA и gyrB).



Топоизомераза IV - из субъединиц parC и parE (соответствующие гены parC и parE). Гены обоих ферментов локализованы на бактериальной хромосоме.

Действие ДНК-гиразы и топоизомеразы IV



Субъединица А ДНК-гиразы разрывает одну нить ДНК для введения отрицательного супервитка. Затем разорванная нить воссоединяется. **Субъединица В** осуществляет гидролиз АТФ, чтобы обеспечить суперскручивание энергией.

Топоизомераза IV катализирует расхождение нитей ДНК.

Механизм развития устойчивости

- Устойчивость к ФХ развивается в результате спонтанных мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в полипептидных цепях ДНК-гиразы или топоизомеразы IV.
- Важны лишь мутации, возникающие в «хинолоновом кармане». Участки получили название «область, детерминирующая устойчивость к хинолонам».

Размер этой области у субъединицы A ДНК-гиразы кишечной палочки составляет около 40 аминокислот. При этом замены некоторых аминокислот приводят к наиболее выраженному снижению аффинности и, к максимальному снижению чувствительности. Так, у *E. coli* замена серина в 83-м положении является наиболее частой мутацией, приводящей к формированию устойчивости.

Устойчивость к фторхинолонам

Для всех ФХ выделяют:

- 1) Первичную мишень (препарат проявляет наибольшее сродство);
- 2) Вторичная мишень

у
грамположительных
бактерий
первичная мишень –
топоизомераза IV,

У грамотрицательных
бактерий
первичная мишень –
ДНК-гираза.

- Спарфлоксацин и гатифлоксацин действуют на – ДНК-гиразу.
- Моксифлоксацин и гемифлоксацин обладают приблизительно одинаковым сродством к обоим ферментам.

Устойчивость к фторхинолонам

- После возникновения мутаций в генах фермента (первичной мишени действия) МПК препаратов обычно повышается в 4-8 раз, а антибактериальный эффект проявляется за счет подавления активности фермента, являющегося вторичной мишенью.
- Если воздействие фторхинолонов на микроорганизм продолжается, то возможно возникновение и селекция мутаций во вторичной мишени и, как следствие, повышение МПК еще в 4-8 раз.
- Для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих ферментов (встречаются реже, чем одиночные).

**МПК – минимальная подавляющая концентрация*

Имитация молекулы-мишени

- Интересный механизм устойчивости к хинолонам обнаружен у *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium bovis*.
- У этих двух видов был обнаружен белок семейства «пентапептидных повторов», кодируемый хромосомным геном *mfpA*.
- Данный белок по окончании фолдинга приобретает структуру, чрезвычайно схожую с двойной спиралью ДНК.
- MfpA симулирует структуру ДНК и тем самым служит мишенью для фторхинолонов, что защищает клетку от губительного взаимодействия антибиотика с ДНК-гиразным комплексом.

*Фолдинг белка – пространственная укладка полипептидной цепи в третичную структуру.

Модификация мишени действия

Приобретение генов менее чувствительной молекулы-мишени от других видов.

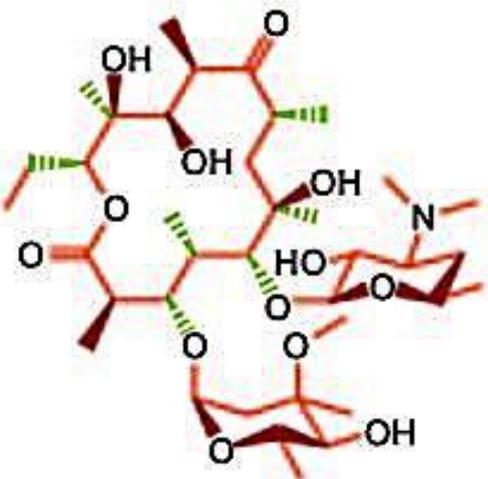
Подобный механизм устойчивости к пенициллину распространен среди устойчивых штаммов *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis*, содержащих мозаичные гены DD-транспептидазы, являющейся мишенью для пенициллина.



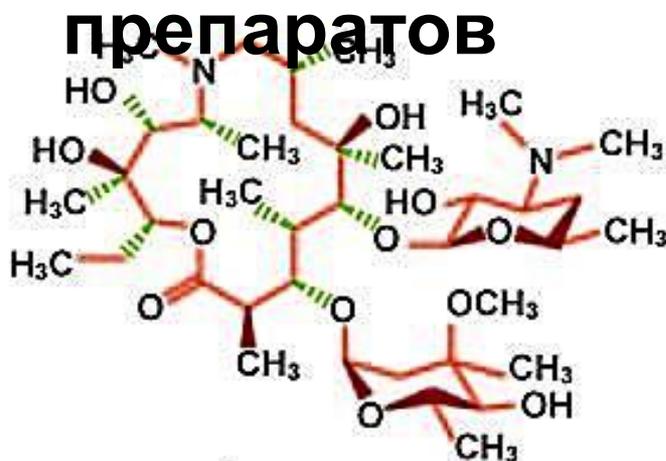
Устойчивость к макролидам, кетолидам и линкозамидам

- Механизм действия антибиотиков данной группы основан на ингибировании биосинтеза белка в результате связывания с 50S субъединицей рибосомы.
- АБ данных групп существенно различаются по своей химической структуре, но их объединяет общий механизм антибактериального действия и механизмы резистентности.

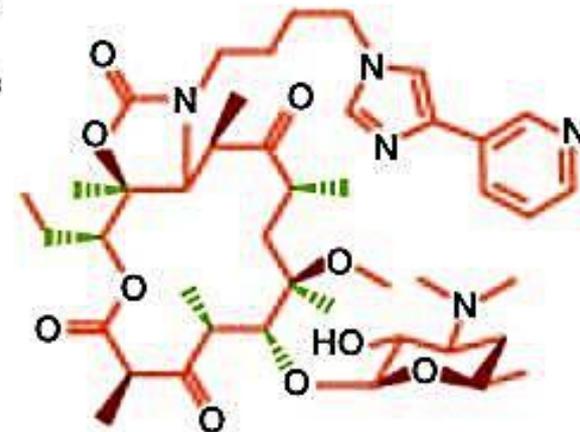
Строение макролидов на примере групп препаратов



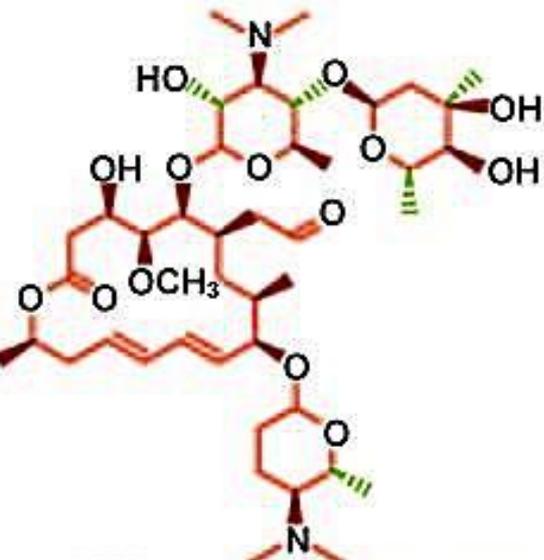
Эритромицин
(14-членный макролид)



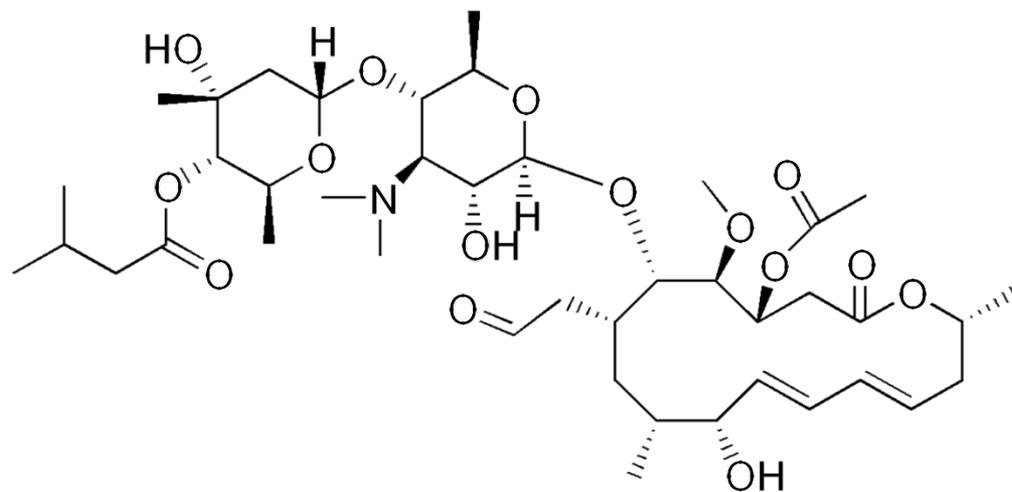
Азитромицин
(15-членный макролид)
(азалиды)



Телитромицин

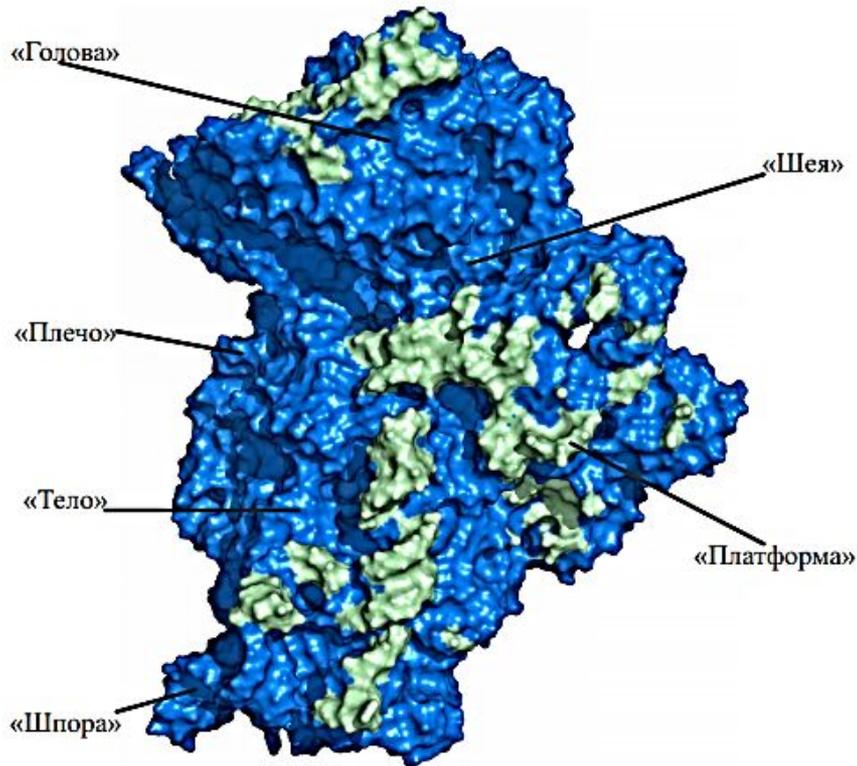


Спирамицин
(16-членный макролид)



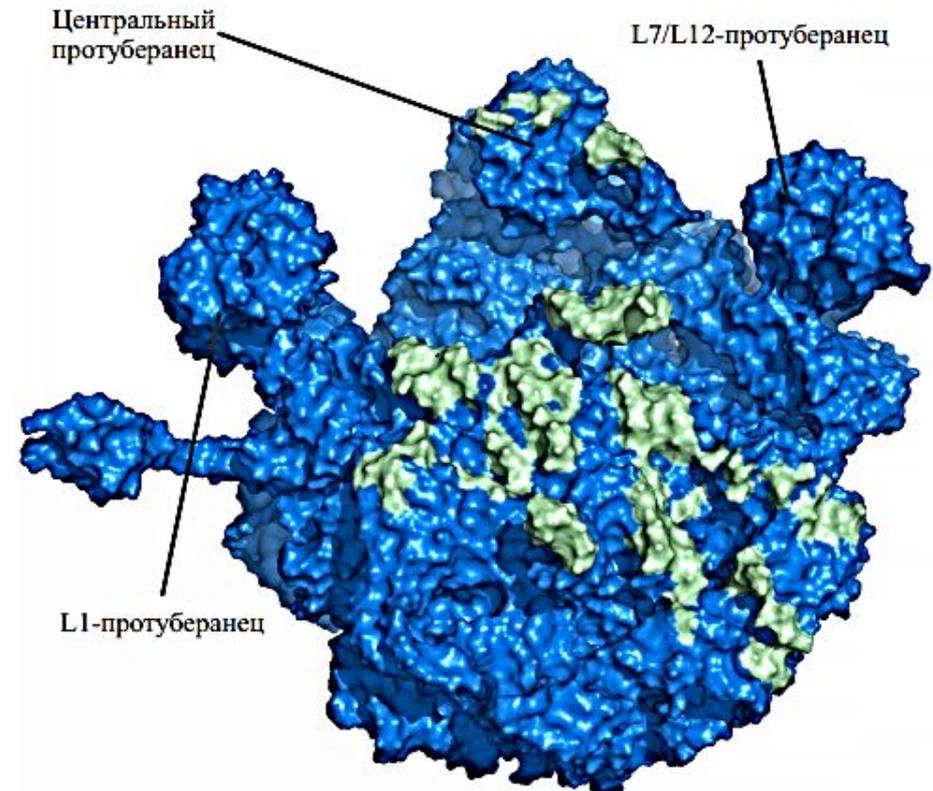
Джозамицин (16-членный макролид)

Рибосома как мишень действия



Малая 30S субъединица
бактериальной рибосомы

большая 50S субъединица
бактериальной рибосомы



Механизм развития устойчивости

1) АБ связывается с доменами II и V рРНК.

Основным участком связывания является домен V, причем основные точки связывания – нуклеотиды в положениях A2058, A2059 и G2505.

2) В пределах домена II АБ взаимодействует с нуклеотидом в положении A752 – характерно для кетолидов (более высокая АБ активность и отсутствие перекрестной устойчивости с макролидами).

- Связь с 23S рРНК препятствует сборке 50S субъединицы и процессу элонгации.
- Модификация 23S рРНК осуществляется в результате:
 - метилирования аденина (в положении 2058);
 - нуклеотидных замены.

Модификация 23S рРНК

2 варианта синтеза

МЕТИЛАЗЫ:

При индуцибельном типе синтеза фермента для его начала необходима индукция.

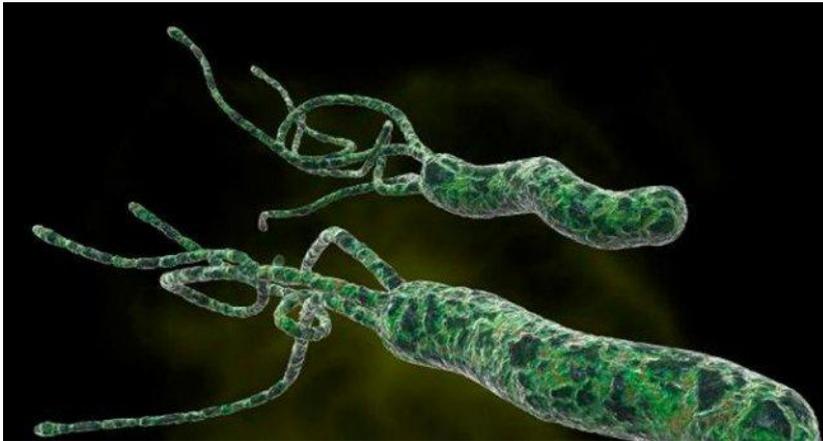
При конститутивном типе синтез фермента не зависит от внешних условий. Соответственно, бактерии проявляют устойчивость ко всем макролидам и линкозамидам.

- **Синтез стрептококковых метилаз** индуцируется всеми макролидами и линкозамидами и микроорганизмы проявляют устойчивость ко всем перечисленным антибиотикам.
- **Синтез стафилококковых метилаз** способен индуцировать только 14- и 15-членные макролиды (устойчивость сохраняется к этим АБ), но сохраняют чувствительность к 16-членным макролидам и линкозамидам.
- В клинической практике могут встречаться стафилококки устойчивые как ко всем макролидам и линкозамидам, так и только к 14- и 15-членным макролидам.

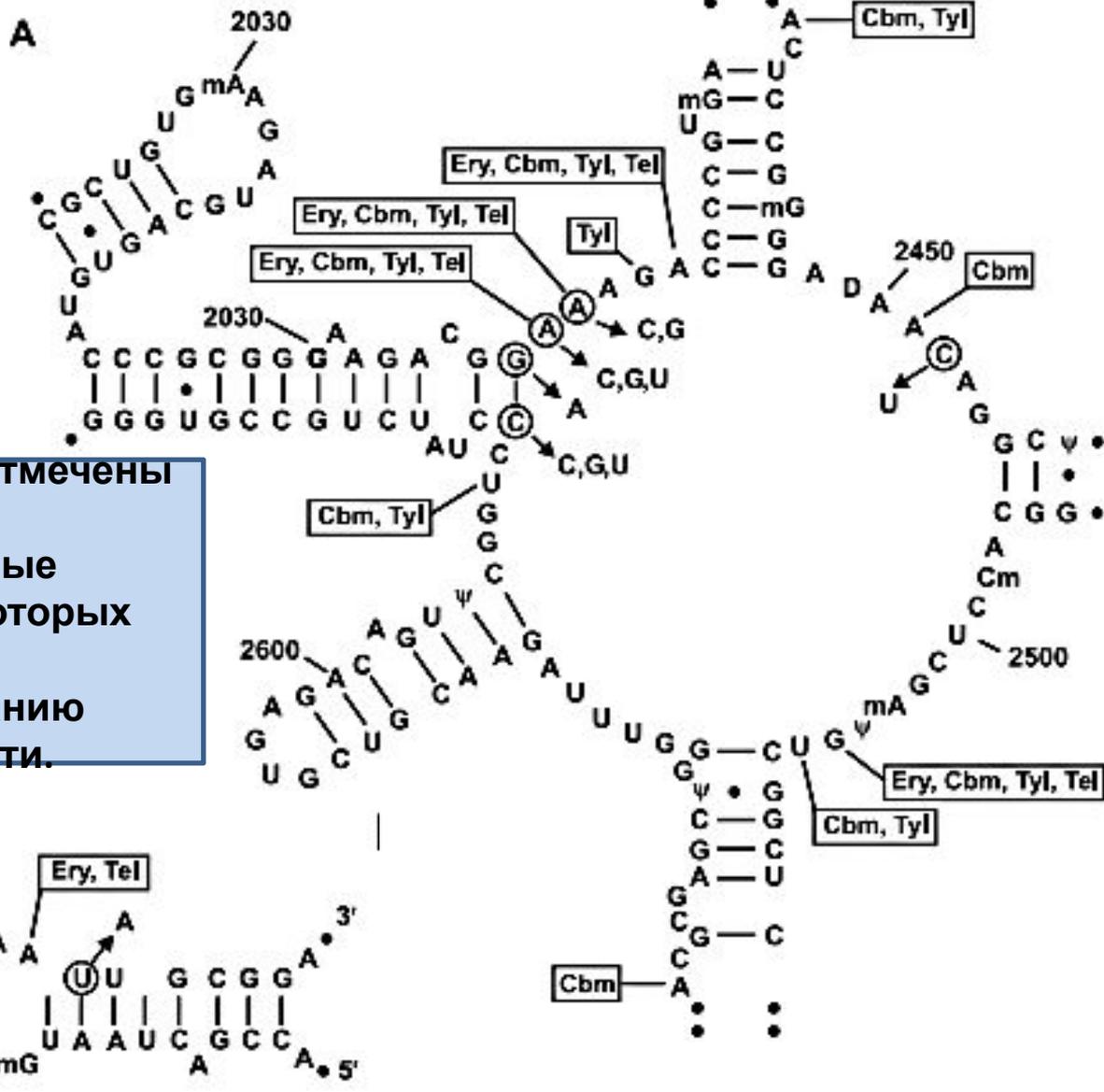
Устойчивость к макролидам, кетолидам и линкозамидам

Вторым механизмом развития устойчивости являются мутации в генах рРНК и рибосомальных белков, приводящие к конформационным изменениям пептидилтрансферного центра и к снижению аффинности препаратов.

Мутации в генах рРНК являются основным механизмом устойчивости к макролидам у *H. pylori*.



Вторичная структура пептидилтрансферного центра и домена V 23S rRNA (A) и шпильки 35 домена II (B).



Ery – эритромицин
Cbm – карбомицин
Tyl – тилозин
Tel – телитромицин.

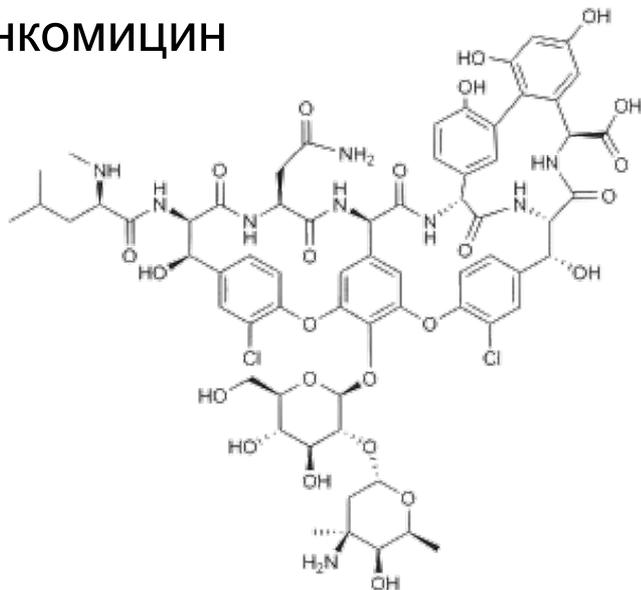
Указаны нуклеотиды, с которыми связываются отдельные представители макролидных АБ.

Кружками отмечены положения, нуклеотидные замены в которых приводят к формированию устойчивости.

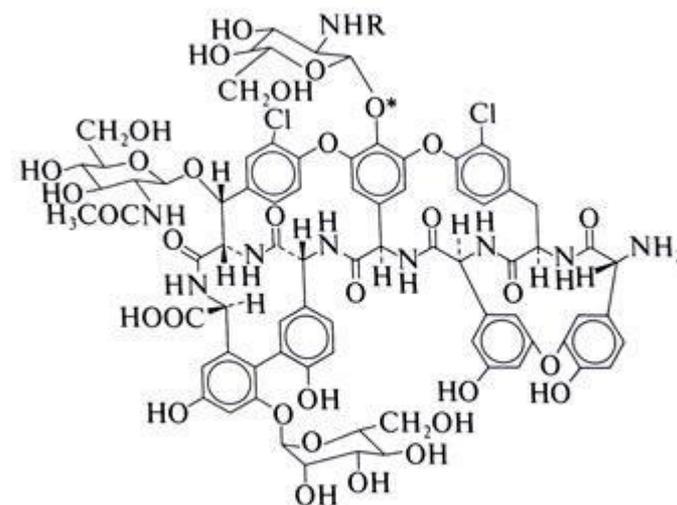
Устойчивость к гликопептидам

- Механизм действия гликопептидов: блокирование завершающей стадии синтеза пептидогликана путем связывания молекулы антибиотика с концевыми аминокислотами в боковой пептидной цепочке (D-аланин-D-аланин).
 - Механизм устойчивости к гликопептидам у энтерококков связан с синтезом бактериями модифицированной боковой
 - полипептидной цепи.
- К гликопептидам относятся природные антибиотики:

ванкомицин



тейкопланин.



Устойчивость микобактерий к рифамицинам

Мишень действия: фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (ген *rpoB*).

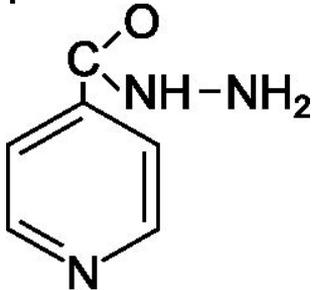
Устойчивость к рифамицинам (рифампицину, рифабутину и др.) (более 95% штаммов) связана с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте β -субъединицы этого фермента. Размер указанного фрагмента составляет 81 пару оснований (27 кодонов).

Пример: наличие мутации в кодонах 526 и 531 приводит к высокому уровню резистентности к рифампицину (МПК < 32,0 мкг/мл) и другим рифамицинам.

Мутации в кодонах 511, 516, 518 и 522 сопровождаются низким уровнем устойчивости к рифампицину и рифапентину, при сохранении чувствительности к рифабутину.

Устойчивость микобактерий к изониазиду

- Изониазид представляет собой пролекарство. При монотерапии изониазидом к нему быстро (в 70% случаев) развивается устойчивость.

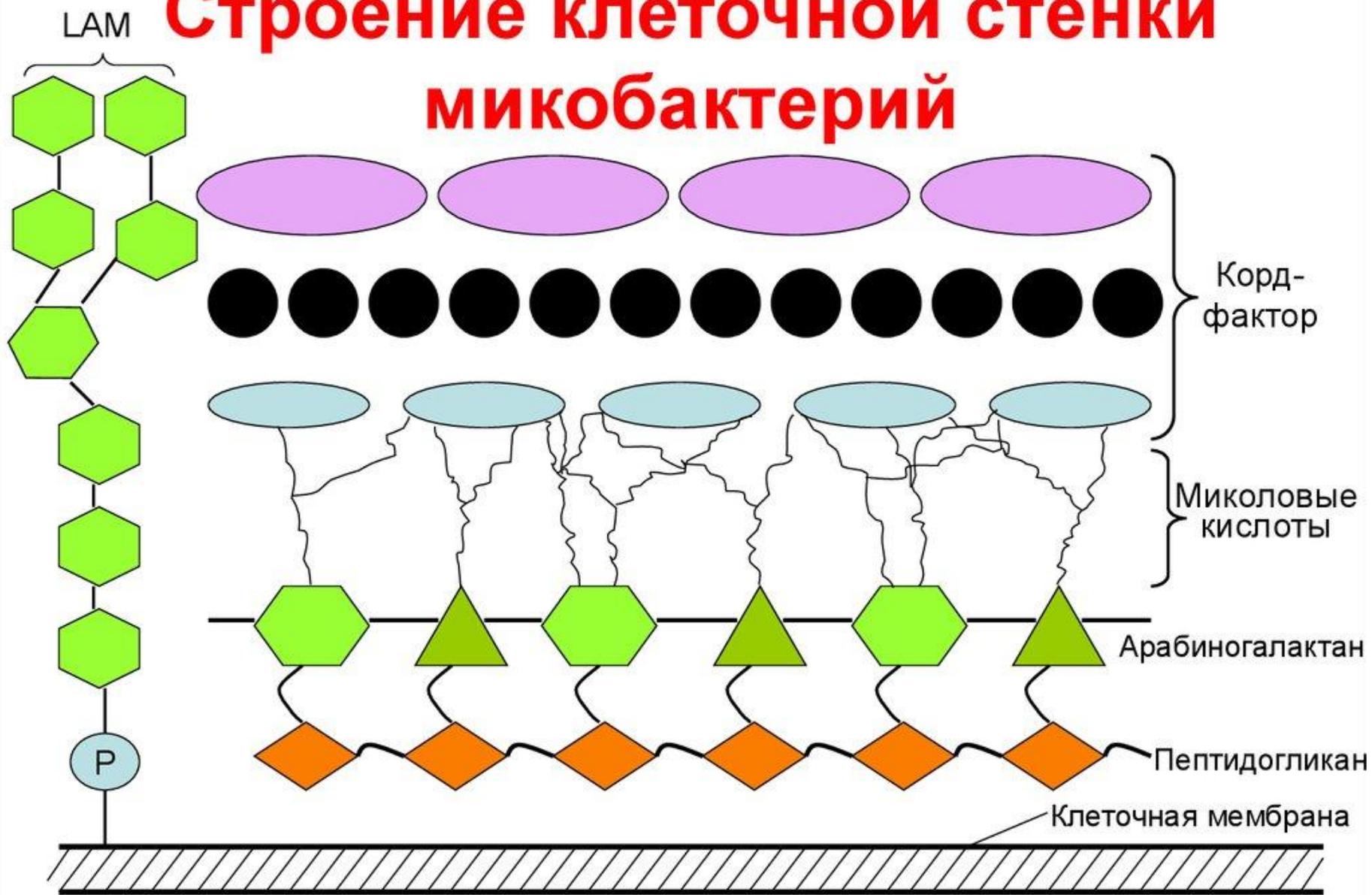


Механизм действия связан с угнетением синтеза миколевой кислоты в клеточной стенке *M.tuberculosis*.

- Одним из механизмом устойчивости микобактерий является **гиперпродукция мишеней действия активных форм препарата.**

Мишени действия: белки, участвующие в транспорте предшественников миколевой кислоты и ее биосинтезе: ацилированный белок-носитель (ген *aspM*), синтетаза (ген *kasA*) и редуктаза (ген *inhA*) белка-носителя. Мутации обычно выявляются в промоторных областях перечисленных генов. Уровень устойчивости, связанной с гиперпродукцией мишеней, как правило, ниже, чем при мутациях в генах каталазы-

Строение клеточной стенки микобактерий



LAM - липоарабиноманнан

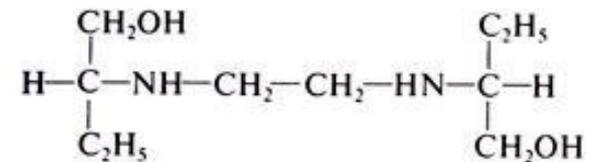
Цитоплазма

Устойчивость микобактерий к этамбутолу

Мишень действия: белок embB (арабинозилотрансфераза), участвующий в биосинтезе компонента клеточной стенки микобактерий - арабиногалактана.

Устойчивость к этамбутолу, в подавляющем большинстве случаев, связана с точечной мутацией в 306 кодоне.

Этамбутол – синтетический ПТП. Активность этамбутола связана с ингибированием ферментов, участвующих в синтезе клеточной стенки микобактерий. Препарат оказывает бактериостатическое действие. Активен только в отношении размножающихся микобактерий.



Этамбутол

Устойчивость к β -лактамам АБ

Мишень действия β -лактамов: ферменты – ПСБ, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых ПСБ уменьшается сродство к β -лактамам(повышается МПК этих препаратов и снижается клиническая эффективность).

Устойчивость стафилококков (S.aureus) обусловлена появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ (ПСБ2а).
Маркером наличия

Клиническое значение имеет устойчивость среди стафилококков и пневмококков. Гены модифицированных ПСБ локализованы на хромосомах.

Выводы

Модификация молекулы-мишени обусловлена разными механизмами:

Пример: мутации в генах, кодирующих, рибосомальный белок RpsL, β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы и фермент ДНК-гиразу, что придаёт клетке устойчивость к стрептомицину, рифамицину и хинолонам.

присутствии антибиотиков.

2) Наличие генов, которые могут передаваться с помощью горизонтального переноса. Продукты этих генов модифицируют молекулу-мишень. В этом случае в результате модификации мишени процесс связывания с ней антибиотика либо частично, либо

Пример: метилирование рРНК эффективно защищает бактериальную клетку от летального действия эритромицина.

функционирование рибосом.

Основные клинически значимые бактерии устойчивы к следующим группам АБ

- **Staphylococcus spp.:** резистентность к природным и полусинтетическим пенициллинам (за счет продукции бета-лактамаз);
- **S.aureus** (метициллинорезистентные): ассоциированная (между разными группами) резистентность к макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, фторхинолонам, ко-тримоксазолу, иногда к ванкомицину;
- **S.pneumoniae:** резистентность к пенициллинам (некоторые штаммы к цефалоспорином 3 поколения); ассоциированная устойчивость к макролидам, тетрациклинам, ко-тримоксазолу;
- **Enterococcus spp.:** ассоциированная резистентность к пенициллинам, аминогликозидам, фторхинолонам, гликопептидам;
- **H.influenzae:** резистентность к полусинтетическим пенициллинам;
- **N.gonorrhoeae:** резистентность к пенициллинам, фторхинолонам, тетрациклинам;
- **Shigella spp.:** резистентность к ампициллину, тетрациклинам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу;
- **Salmonella spp.:** резистентность к ампициллину, цефалоспорином 3 поколения, хлорамфениколу, фторхинолонам, ко-тримоксазолу;
- **E.coli:** резистентность к ампициллину, гентамицину, ко-тримоксазолу, фторхинолонам, некоторые штаммы — к карбапенемам;
- **Klebsiella spp.:** резистентность ко всем цефалоспорином; ассоциированная устойчивость к гентамицину и фторхинолонам;
- **P. mirabilis:** устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином 1 поколения;
- **Pseudomonas spp., Acinetobacter spp., S.maltophilia:** ассоциированная резистентность к цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам, иногда к карбапенемам.

Спасибо за внимание!

