

Przegląd mechanizmów działania i oporności na antybiotyki hamujące biosyntezę ściany komórkowej

Michał Główka

*Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z
O. A. M.*

Email: michalzdzislawglowka@gmail.com

Od zastosowania pierwszego antybiotyku, penicyliny benzylowej, upłynęło niemal 80 lat. Początkowo skuteczny antybiotyk stał się mało znaczący i w niewielkim stopniu użyteczny w terapii. Stało się tak dlatego, że bakterie poddane działaniu penicyliny benzylowej, ale także innych antybiotyków β -laktamowych nabyły oporności na nie, co oznacza, że zastosowanie dawek, do tej pory, terapeutycznych nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Los penicyliny benzylowej podzieliło wiele antybiotyków, co budzi uzasadnioną obawę w kręgach akademickich i medycznych odnośnie przyszłości leczenia infekcji bakteryjnych. Taki stan rzeczy nie powinien nas dziwić, jeśli zdamy sobie sprawę z tego, z jaką szybkością namnażają się bakterie, a więc jakie mają możliwości mutowania, co zresztą umożliwiło ich przodkom przeżycie w nieprzyjnym świecie i utworzenie obecnych form życia. Wraz z obserwowaniem oporności zauważono wiele przypadków przełamania oporności, dlatego warto zapoznać się z bardziej szczegółowym mechanizmem działania oporności, by w przyszłości móc je przełamywać, lub "omijać", a nawet nie dopuścić do ich powstania, w przyszłości.

Mechanizmy oporności

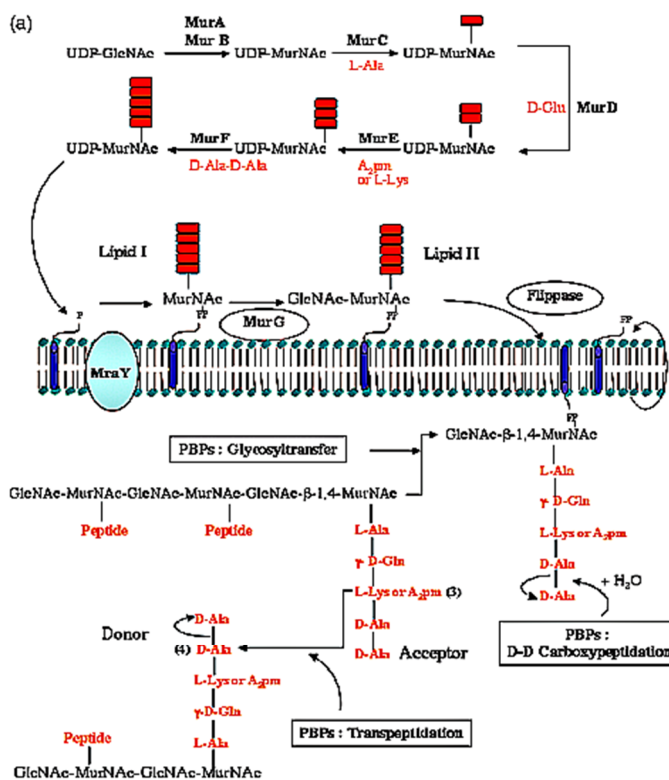
Bakterie to bardzo stare ewolucyjnie i "zaradne chemicznie" organizmy. Potrafią przetrwać w bardzo niesprzyjających warunkach, np. pospolity *Pseudomonas aeruginosa* potrafi przetrwać w wodzie destylowanej, na klamkach i innych nieprzyjnych miejscach. Nie powinno to nas dziwić ze względu na długą historię tych organizmów i warunki panujące na naszej planecie na początku jej istnienia, które nie sprzyjały życiu, a musiały zostać przezwyciężone. Bakterie przetrwały te niesprzyjające warunki dzięki biochemii swoich komórek, pozyskując energię najpierw w reakcjach beztlenowych, a następnie tlenowych. Tak jak z rozkładem celulozy, czy zabiciem człowieka, tak też z antybiotykami bakterie radzą sobie dobrze, poprzez wykształcenie oporności, czyli zdolności przetrwania w obecności terapeutycznego stężenia antybiotyku. Dzieje się tak dzięki mutacją jakie zachodzą z pokolenia na pokolenie bakterii, a są one zdolne do podziału nawet co 20 min i selekcję szczepów opornych, tj. zabicie komórek wrażliwych, co powoduje namnażanie tych, które przeżyją, które są odporne. Istnieją różne mechanizmy oporności na antybiotyki: 1) dezaktywacja antybiotyku 2) uniemożliwienie penetracji leku do komórki 3) zmiana miejsca wiązania, tak aby nowy enzym nie wiązał się z antybiotykiem. [1]

Ryc. 1. Przegląd mechanizmów oporności wybranych grup antybiotyków

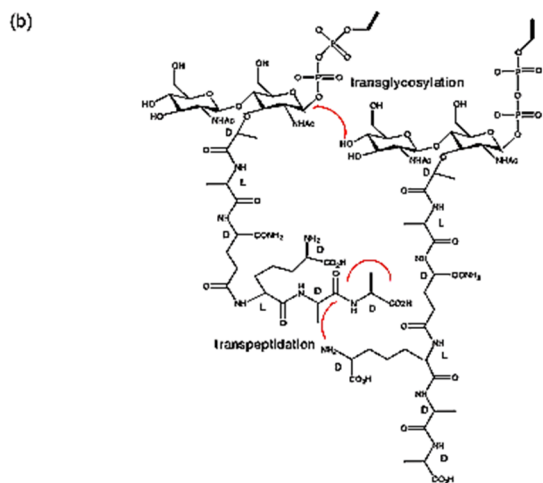
Grupa antybiotyków działające na syntezę ściany komórkowej	Mechanizm działania	Mechanizm oporności
β -laktamowe	Inhibitory transpeptydaz (PBP), enzymu biorącego udziału w sieciowaniu peptydoglikanów do mureiny [1,2]	Synteza β -laktamaz; zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej; synteza PBP niereagujących z antybiotykami [1,2]
Glikopeptydowe	Inhibitory transglikolazy [1,2]	Modyfikacja substratu do budowy ściany komórkowej [1,2]
Inne: -fosfomycyna	-Inhibitor UDP-N-acetyloglucosamino-3-O-enolopirogroniano transferazay (MurA, patrz Fig.1) [x1]	-Zmniejszenie ekspresji transporterów GlpT i UhpT odpowiedzialnych za transport leku i cukrów do komórki bakteryjnej [1]

Antybiotyki β -laktamowe

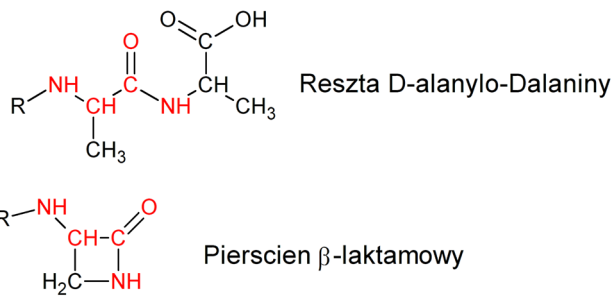
Leki β -laktamowe są najstarszą grupą antybiotyków, ich protoplastą jest penicylina benzylova. Nazwę zawdzięczają obecności pierścienia β -laktamowego w swojej strukturze, który warunkuje ich działanie. Antybiotyki te działają jako inhibitory transpeptydaz, zwanymi także białkami wiążącymi penicyliny (PBP). Są to licznej grupy enzymów biorących udział w syntezie ściany komórkowej bakterii w procesie transpeptydacji. [3] Dzięki chemicznemu podobieństwu do grupy D-alanylo-D-alaninowej, która związana z acetyloglukozaminą i kw. N-acetylomuraminowym buduje substrat do syntezy peptydoglikanu w procesie sieciowania, w którym usuwana jest terminalna D-alanina dla utworzenia wiązania D-alaniny z innym aminokwasem analogicznej struktury. Antybiotyki β -laktamowe działają jako inhibitory PBP, co przerywa proces sieciowania peptydoglikanu i syntezę ściany komórkowej bakterii. [2,3] Inhibicja PBP polega na "udawaniu" substratu do syntezy ściany komórkowej przez antybiotyk β -laktamowy, który po związaniu z PBP łączy się z nim trwale i uniemożliwia sieciowanie peptydoglikanu, przez zajęcie miejsca aktywnego enzymu. [1,2]



Ryc.2. Schemat syntezy ściany komórkowej



Ryc. 3. Porównanie pierścienia β-laktamowego (z podstawnikiem zazwyczaj w nim występującym) i reszty D-alanylo-D-alaniny



Źródło: [3]

Po zahamowaniu syntezy ściany komórkowej przez związanie antybiotyku z grupy β-laktamów komórka bakteryjna ulega rozpadowi w procesie autolizy, przez co antybiotyki te działają bakteriobójczo.

W procesie autolizy kluczową rolę odgrywa wzrost stężenia rodników hydroksylowych, spowodowany przez zaburzenie bakteryjnych szlaków enzymatycznych dezaktywujących rodniki hydroksylowe do nieszkodliwych produktów. [1,5]

Dla antybiotyków β-laktamowych obserwuje się 3 główne typy oporności: zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej, syntezę β-laktamaz i syntezę PBP, które nie wiążą β-laktamów.

Nabycie oporności przez zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej jest głównym mechanizmem oporności bakterii Gram ujemnych, gdyż ich ściana komórkowa zbudowana jest w sposób zapewniający “większą kontrolę” nad składnikami dostającymi się do komórki bakteryjnej. Ściana komórkowa bakterii Gram (-) jest dwuwarstwowa pokryta błoną i posiadająca przestrzeń periplazmatyczną pomiędzy warstwami. Budowa taka bardzo

ogranicza bierną dyfuzję związków do komórki, transport związków do komórki regulują białka związane z zewnętrzną błoną. Dzięki usunięciu, lub modyfikacji białek biorących udział w transporcie związków chemicznych do komórki bakterie te mogą ograniczyć, lub zahamować napływ antybiotyku do wnętrza komórki. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram (+) przypomina raczej gąbkę, która nie stawia dużych przeszkód przy biernej dyfuzji związków. [1]

Synteza β -laktamaz to mechanizm oporności obserwowany tak u bakterii Gram (+) jak i Gram (-), polega on na syntezie enzymów rozkładających antybiotyki β -laktamowe przez hydrolizę wiązania amidowego w pierścieniu β -laktamowym. Rozmieszczenie β -laktamaz różni się w zależności od bakterii, bakterie Gram (+) wydzielają enzymy “przed siebie”, do środowiska w którym są, natomiast bakterie Gram (-) wydzielają β -laktamazy do przestrzeni periplazmatycznej, dzięki czemu osiągają większe stężenie enzymu przy mniejszej jego produkcji i uznaje się, że jest to najważniejszy mechanizm oporności bakterii Gram (-) na β -laktamy. [1,6] Enzymy hydrolizujące β -laktamy nie są jednorodną grupą, i tak w zależności od systemu klasyfikacji dzieli się je na:

Ze względu na podobieństwo w sekwencji aminokwasów
<p>Klasa A</p> <p>Penicyliny</p> <p>Klasa B</p> <p>Metallo β-laktamazy (cynkowe)</p> <p>Klasa C</p> <p>Cefalosporynazy</p> <p>Klasa D</p> <p>Oksacyliny</p>
Ze względu na substrat i profil działania, wg. grupy Bush-Jacoby-Medeiro
<p>Grupa 1</p> <p>Cefalosporynazy, hydrolizują cefalosporyny o szerokim spektrum, odporne na kwas klawulanowy</p> <p>Grupa 2</p> <p>Cała grupa wrażliwa na kwas klawulanowy</p>

2a

Penicyliny

2b

Penicyliny o szerokim spektrum

2be

ESBLs

2br

Oporne na inhibitory

2c

Hydrolazy karbenicylin

2d

Hydrolazy oksacylin

2f

Karbapenemazy

Grupa 3

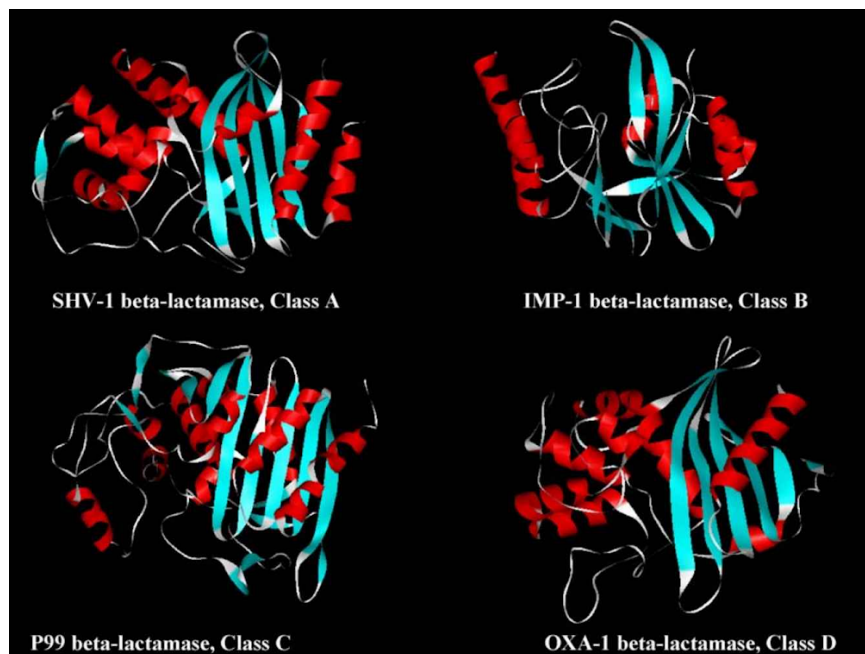
Metallo β -laktamazy, hydrolizują imipenem, odporne na kw. klawulanowy, hamowane przez EDTA

Grupa 4

Różne, pozostałe

Na podstawie: [6]

Ryc. 4. Porównanie budowy przestrzennej poszczególnych klas β -laktamaz

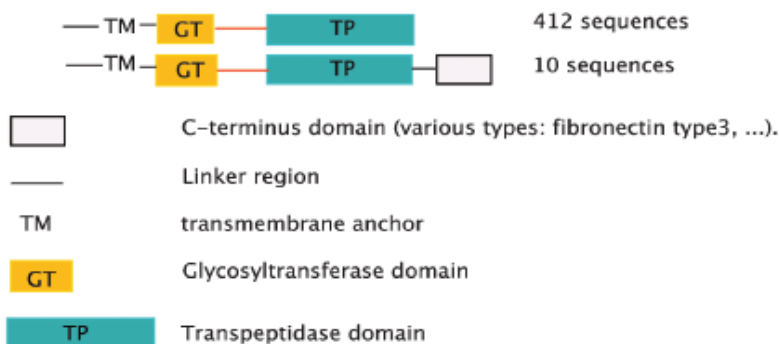


Źródło: [6]

Wymienione tutaj klasy i grupy β -laktamaz różnią się substratem, który hydrolizują i tak penicylinazy rozkładają penicyliny, cefalosporynazy cefalosporyny itd., oraz różnią się opornością na czynniki hamujące ich aktywność. Jeżeli β -laktamaza nie jest oporna na kwas klawulanowy, znaczy to że jej właściwości hydrolizy β -laktamów zostają zahamowane przez kwas klawulanowy, naturalny inhibitor β -laktamaz, sulbaktam i tazobaktam, syntetyczne inhibitory. Budowa chemiczna tych związków jest bardzo podobna do budowy antybiotyków, dzięki temu są one także substratem dla β -laktamaz, jednak po hydrolizie na trwale wiążą się z β -laktamazą i prze to, tak jak antybiotyki hamują aktywność PBP, związki te blokują aktywność β -laktamaz, co pozwala antybiotykom osiągnąć stężenie terapeutyczne. Niestety nie wszystkie β -laktamazy są podatne na działanie inhibitorów, a metalo- β -laktamazy zawierające w swoim centrum aktywnym jon cynku są jedną z klas β -laktamaz opornych na wymienione inhibitory, ale wrażliwą na EDTA. Do działania metalo- β -laktamaz wymagana jest obecność jonu cynku (Zn^{2+}) w miejscu aktywnym enzymu. Dzięki trwałemu i mocnemu kompleksowaniu jonów metali przez EDTA jest możliwe zahamowanie aktywności metalo- β -laktamaz przez pozabawienie ich jonu cynku z miejsca aktywnego. Ponadto mechanizm ten może zostać przełamany przez takie zaprojektowanie cząsteczki leku, by był on oporny na β -laktamazy, poprzez wprowadzenie odpowiednio rozbudowanego podstawnika stanowiącego zawadę steryczną dla enzymu, która uniemożliwia hydrolizę leku. Przykładem takiego antybiotyku jest kloksacylina, lek z grupy penicylin opornych na β -laktamazy, ale nie wszystkie, rozkładają ją β -laktamazy o rozszerzonym spektrum. [1,2,6]

Synteza PBP nie reagujących z antybiotykami β -laktamowymi jest ważnym mechanizmem, oporności odpowiedzialnym za oporność na szerokie spektrum β -laktamów. Najbardziej znanym przykładem są szczepy *Staphylococcus Aureus* opornego na metycylinę (MRSA). Mechanizm ten jest ważny nie tylko ze względu na powstawanie oporności na całą grupę leków, MRSA jest oporny na wszystkie β -laktamy, poza piperacyliną i nielicznymi lekami β -laktamowymi, ale także dlatego, że nie można zastosować inhibitorów jak w przypadku poprzedniego mechanizmu oporności. Za powstawanie tego typu oporności odpowiada duża różnorodność klas PBP, co wynika z mutacji. Znane jest ponad 430 klas PBP A i 350 klas B, co odzwierciedla dużą zmienność genomu bakteryjnego i możliwości przystosowania się do nowych warunków.[1,2,4]

(a) **Class A enzymes**



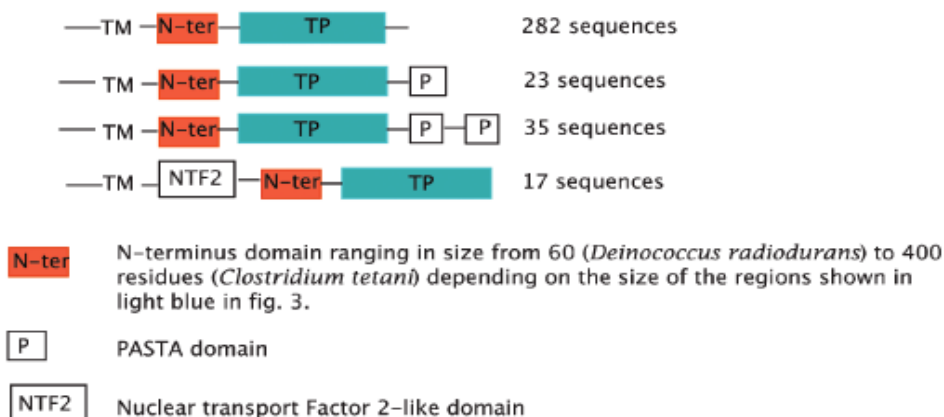
Ryc. 5. Klasy B-laktamaz

Źródło:[4]

(b) **Mono Glycosyltransferases**



(c) **Class B enzymes**



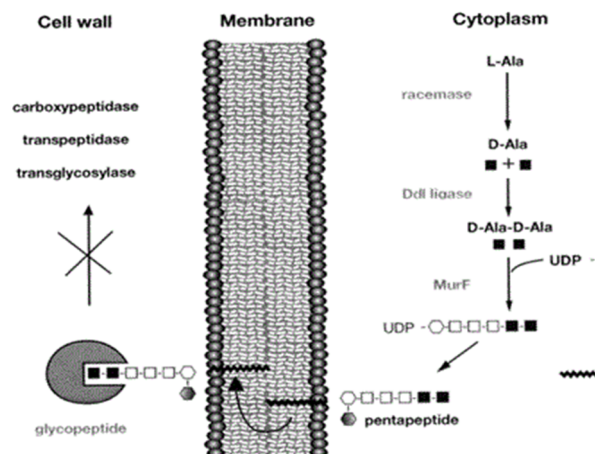
Antybiotyki glikopeptydowe

Są to wielkocząsteczkowe peptydoglikany, wykazujące działanie bakteriobójcze tak na bakterie Gram (+), jak i Gram (-), tlenowe i beztlenowe. Są szczególnie ważne przy leczeniu zakażeń gronkowcami, enterokokami i *Clostridium difficile*. Jest to mała grupa antybiotyków, w której skład wchodzi wankomycyna i teikoplanina. Wankomycyna znana jest jako antybiotyk stosowany przy zakażeniach MRSA, gdyż nie występuje oporność krzyżowa między β -laktamami, a glikopeptydami. Glikopeptydy blokują biosyntezę ściany komórkowej w innym niż β -laktamy miejscu. Wiążą się one z resztą D-alanylo-D-alaniny substratu do syntezy ściany i sieciowanych łańcuchów peptydoglikanu, przez co PBP nie mogą związać się z resztą D-alanylo-D-alaniny, z powodu zawady sterycznej. [1,2,7-10]

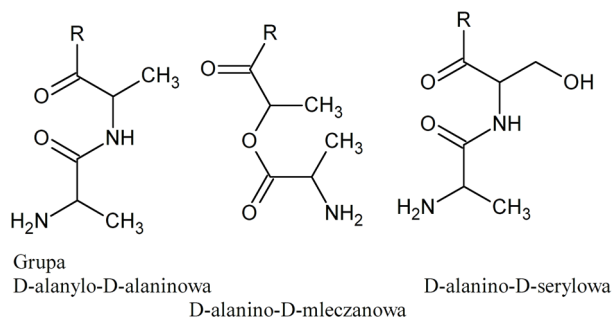
Podczas obserwacji szczepów *Staphylococcus aureus* o zwiększonej oporności na wankomycynę (VISA), zauważono że jego ściana składająca się z peptydoglikanu jest o wiele grubsza, niż u szczepów wrażliwych na wankomycynę. Zauważono, że ściana komórkowa tych szczepów ma grubość 30-40 warstw peptydoglikanu, gdzie dla szczepów wrażliwych jest to około 20 warstw. Takie zwiększenie grubości ściany komórkowej utrudnia penetrację wankomycyny, a co za tym idzie powoduje, że potrzebne jest większe stężenie by wysycić wszystkie punkty uchwytu. Wzrost grubości ściany komórkowej związany jest z obniżeniem aktywności enzymów rozkładających ścianę komórkową w przypadku szczepów VISA, która wraca do normy, po utracie oporności na wankomycynę. [7,9]

Istnieje sześć typów oporności na antybiotyki glikopeptydowe, wyodrębnionych na podstawie fenotypu, jak i genotypu w rodzaju enterokoków. Pięć typów to typy oporności nabytej, są to: Van A,B,D,E i G. Natomiast szósty Van C to typ oporności odpowiedzialny za oporność naturalną *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*. Poszczególne typy oporności różnią się stopniem oporności na glikopeptydy. Typ oporności Van A zapewnia wysoką oporność na wankomycynę i teikoplaninę, Van B zapewnia zróżnicowany poziom oporności jedynie na wankomycynę, Van D umiarkowaną oporność na oba glikopeptydy, a Van C,E i G oporność na niskie stężenia wankomycyny, nie powodują oporności na teikoplaninę. Wszystkie wymienione typy oporności powodują modyfikacje substratu do syntezy peptydoglikanu.[10] Jedna z D-alanin zostaje zamieniona na kwas D-mlekowy lub D-serynę, co powoduje znaczny spadek siły wiązania pomiędzy wankomycyną, a zmienionym substratem z resztą D-alanylo-D-mlekową lub D-alanylo-D-serynową zamiast D-alanylo-D-alaninowej. Typy Van A,B,D powodują zamianę D-alanylo-D-alaniny na D-alanylo-D-mleczan, natomiast Van C,E,G powodują zamianę na D-alanylo-D-serynę. Znaczny spadek siły wiązania wankomycyny ze zmienionym substratem wynika z utraty możliwości utworzenia jednego wiązania wodorowego, które jest kluczowe dla tworzenia kompleksu z wankomycyną. Jest to mechanizm dający dużą oporność na wankomycynę. [8,9,10]

Ryc. 6. Mechanizm działania glikopeptydów



Ryc. 7. Porównanie grupy wiążącej glikopeptydy i jej modyfikacji



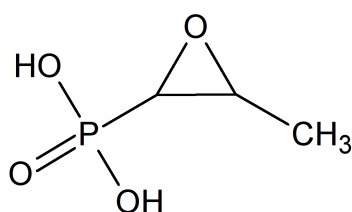
Fosfomycyna

Została odkryta w 1969 roku, jako wtórny metabolit kilku szczepów rodzaju *Streptomyces spp.* W przeciwieństwie do poprzednio prezentowanych antybiotyków jest ona prostą i małą cząsteczką, a jednak wykazuje szerokie spektrum działania, znajdują się w nim bakterie Gram (+) i Gram (-), oportunistyczne i patogenne. W połączeniu z innymi antybiotykami wykazuje działanie synergistyczne i nie występuje dla niej krzyżowa oporność, dzięki innemu punktowi uchwytu. Jej systematyczna nazwa to kwas [(2R,3S)-3-metylooksiran-2-ylo]fosforowy. Obecny w cząsteczce epoksyd jest stabilny i konieczny, tak jak połączenie fosfor-węgiel, dla terapeutycznego działania tego leku. [11,12] Stabilność ugrupowania epoksydowego jest cechą wyjątkową, gdyż epoksydy są klasą związków bardzo reaktywnych.

Fosfomycyna działa bakteriobójczo poprzez blokowanie syntezy ściany komórkowej w innym niż powyżej omówione antybiotyki. Ze względu na podobieństwo do fosfoenolopirogronianu (PEP) fosfomycyna blokuje początkowy etap powstawania ściany komórkowej, poprzez inhibicję działania MurA. Enzym ten katalizuje przyłączenie PEP do UDP-GlcNAc (patrz schemat działania β -laktamów). [13]

Oporność na fosfomycynę występuje rzadko i nie różni się znacząco między krajami, w których fosfomycyna jest od dawna stosowana, a tymi gdzie nie wprowadzono jej do lecznictwa. W przypadku *E. coli* antybiotyk jest transportowany do komórki przez transportery nazwane GlpT i UhpT. [14,15] GlpT jest to błonowy transporter, którego pełna nazwa to transporter glicerolo-3-fosforanu. Jak nazwa wskazuje GlpT odpowiada za transport glicerolo-3-fosforanu do komórki bakteryjnej z jednoczesnym transportem fosforanu nieorganicznego na zewnątrz komórki. Drugi z wymienionych transporterów, UhpT, jest ściśle spokrewniony z GlpT. Pełna nazwa UhpT to transporter heksozo-6-fosforanu. [16-18] Fosforany transportowane przez wymienione transportery stanowią dla

bakterii źródło energii do życia i namnażania się. [19] Wraz z opornością bakterii na fosfomicynę obserwuje się spadek ekspresji, lub mutacje w obrębie genów kodujących GltT i UhpT. Spadek ekspresji transporterów zmniejsza wchłanianie antybiotyku do komórki bakteryjnej, ale równocześnie zmniejsza jej możliwości pobierania związków energetycznych ze środowiska, a co za tym idzie zmniejsza jej tempo wzrostu. Zmniejszone tempo wzrostu bakterii utrudnia jej kolonizację układu moczowo-płciowego, ze względu na wypłukiwanie bakterii przez mocz, co powoduje, że nie może ona odtworzyć swej populacji. Dlatego w przypadku zakażeń układu moczowo-płciowego rzadko obserwuje się oporność bakteryjną na fosfomicynę. [14,15]



Ryc.8. Struktura fosfomicyny

Bibliografia

1. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2011). Mikrobiologia. Wrocław: Elsevier Urban & Partner
2. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. (2010). Farmakologia i toksykologia. Wrocław: Medpharm
3. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M. et al. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS microbiology reviews, 32(2), 234-258.
4. Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V. et al. (2006). Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. FEMS microbiology reviews, 30(5), 673-691.
5. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B. et al. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell, 130(5), 797-810.
6. Babic, M., Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug resistance updates, 9(3), 142-156.
7. Hiramatsu, K. (2001). Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance. The Lancet infectious diseases, 1(3), 147-155.
8. Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 8(11), 943-950.

9. Allen, N. E., & Nicas, T. I. (2003). Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 26(5), 511-532.
10. Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Supplement_1), S25-S34.
11. Michalopoulos, A. S., Livaditis, I. G., & Gougoutas, V. (2011). The revival of fosfomycin. *International journal of infectious diseases*, 15(11), e732-e739.
12. Popovic, M., Steinort, D., Pillai, S., & Joukhadar, C. (2010). Fosfomycin: an old, new friend?. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 29(2), 127-142.
13. Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics*, 2(2), 217-236.
14. Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O. et al. (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2850-2858.
15. Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., et al. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 333-337.
16. Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., et al. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, 301(5633), 616-620.
17. Law, C. J., Yang, Q., Soudant, C., et al. (2007). Kinetic evidence is consistent with the rocker-switch mechanism of membrane transport by GlpT. *Biochemistry*, 46(43), 12190-12197.
18. Enkavi, G., & Tajkhorshid, E. (2010). Simulation of spontaneous substrate binding revealing the binding pathway and mechanism and initial conformational response of GlpT. *Biochemistry*, 49(6), 1105-1114.
19. Gottschalk, G. (2012). *Bacterial metabolism*. Springer Science & Business Media.

Abstract

From first use of antibiotic, the benzylpenicillin, have passed almost 80 years. By this time first very useful antibiotic become one of model but not very useful in therapy. It is because of bacterial resistance to β -lactam antibiotics. Resistance means that doses which were therapeutic now have no or very weak effect and even in some cases doses should be greater than lethal, for human, dose to kill bacteria. Not only for benzylpenicillin bacteria become resistant and this fact cause very racional concern in academic societies about the future of bacterial infection therapy. This fact shouldn't be unlikely for us because of rapid bacteria division in conducive conditions witch gives bacterias possibility of many mutations in short time and that makes them very resistant to many threats. With observing new resistant mechanism we spot also cases of breaking bacterial resistance. That is why it is worthwhile to study resistant mechanisms because knowing them we can decrease number of resistant strains, break new resistances and maybe even don't allow bacteria to acquire resistance.