

Alternativa antibiotik – blokátory virulence bakterií

(Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria)

Keyser P., Elofsson M., Rosell S., Wolf-Watz H. (Innate Pharmaceuticals AB, Umetan Företagspark ; Umeå University , Sweden)

Journal of INTERNAL MEDICINE, Vol. 264, 2008, č. 1, s. 17-29)

Volně přeložil a zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

Abstrakt: V posledních letech hromadí se potíže s bakteriemi rezistentními na antibiotika vedly k předpovědi, že se vracíme do doby před objevem antibiotik. Jednou z možností jak tomu předejít může být zavádění nových antibakteriálních preparátů, účinkujících jinak než konvenční antibiotika. Novější studie faktorů virulence a toxinů bakterií umožnily lepší poznání způsobů, jakými patogenní bakterie ovlivňují procesy v buňkách hostitele. Toho lze využít pro vývoj nových antibakteriálních léků, které zneškodní patogenní bakterie. Víme, že široké spektrum Gram-negativních bakterií využívá účinný mechanismus virulence v podobě sekrečního systému typu III (T3SS), který jim umožňuje injikovat do cytosolu lidské, zvířecí či rostlinné hostitelské buňky své efektorové proteiny. Onemocnění jako dýmějový mor, bacilární úplavice, salmonelózy, břišní tyfus, plicní infekce, sexuálně přenosné chlamydiózy i průjmy z velké části využívají T3SS mechanismu ke vpravování bakteriálních proteinů do buněk hostitele. V poslední době se podařilo výběrovým skríníngem najít řadu inhibitorů T3SS. Chemickým úpravám a testování optimální účinnosti byla podrobena v několika *in vitro* a *ex vivo* studiích jedna skupina inhibitorů – salicylované acylhydrazidy (*salicylidene acylhydrazides*). Zkoušky proběhly u řady druhů bakterií, včetně *Yersinia* spp., *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp. a *Pseudotuberculosis aeruginosa*. Dosud známé výsledky ukazují, že T3SS inhibitory se mohou stát novými antibakteriálními léky.

Klíčová slova: antibiotikorezistence, sekreční systém typu III, blokátory virulence

Úvod

Ze všech druhů léků jsou antibiotika asi nejúspěšnější. Pokles úmrtnosti a nemocnosti na bakteriální infekce po podávání antibiotik je příkladem mimořádného úspěchu. V poslední době se však hromadí problémy související s rezistencí bakterií na antibiotika, což vede dokonce k tvrzení, že se vrátíme do předantibiotické éry. Vznik rezistentních bakterií se stal závažným zdravotním problémem. Další využívání antibiotik bude záviset na nových antibakteriálních léčích, majících jiné aktivní složky, než současná antibiotika. Je však otázka jak najít a vhodně využít molekuly těchto nových složek. Antibakteriální léky využívané v současnosti kliniky pochází z poměrně malého počtu zdrojů. Tři čtvrtiny běžně užívaných antibiotik spadají prakticky do čtyř skupin: betalaktamáty, aminoglykosidy, makrolidy a chinolony. Mnoho z nich se již desítky let užívá proti velkému počtu různých bakterií. Léčba chinolony začala v roce 1962, ale trvalo 40 let než byl schválen a do oběhu puštěn zatím poslední z nich – oxazolidinon linezolid. Totéž lze říci o zdokonalovaných farmakodynamických a farmakokinetických vlastnostech jiných preparátů druhé a třetí generace. I když představují značné zlepšení, žádný nový preparát nemá zcela odlišnou molekulární strukturu a co více, jejich působení je stejné jako u již existujících léků.

Řada farmaceutických firem se v 90. letech minulého století zabývala hledáním geneticky odlišných léků s možností jejich výroby ve velkém. Sekvenováním prvního bakteriálního genomu *Haemophilus influenzae* v roce 1995 stouply naděje na objevy nových látek

s antibakteriálním účinkem. Mezi roky 1996 až 2004 provedlo 34 farmaceutických firem více než 125 testů antibakteriální účinnosti u 60 různých sloučenin. Je pozoruhodné, že žádný z testů nevedl k objevu látky s novým mechanismem účinku. Naděje, že se najde několik nových antibakteriálních léků, skončila zklamáním a farmaceutické firmy pak ztratily zájem o tento směr výzkumu.

Ukázalo se, že je třeba najít jiné cesty k hledání nových látek s antibakteriálním účinkem. Tradiční antibiotika bakterie zabíjí nebo brání jim růstu, dělí se tedy na baktericidní nebo bakteriostatická. Jejich velkou nevýhodou je to, že napadají nejen bakterie vyvolávající infekci, ale i jiné bakterie. Přitom se v zažívacím, dýchacím traktu a na kůži nachází normální mikroflóra, nezbytná pro udržování rovnováhy zdraví. Poškození normální mikroflóry antibiotiky pak umožňuje růst rezistentních bakterií.

U patogenů se jen vzácně vyvine antibiotikorezistence v průběhu podávání antibiotik. Naopak, rezistence vzniká u velké části residentní, nepatogenní mikroflóry zažívacího traktu. Patogenní bakterie zpočátku získávají svou rezistenci horizontálním přenosem genů od residentní normální mikroflóry. Nové patogenní klony bakterií se rychle šíří a působí infekce, vzdorující podávaným lékům.

Možnost jak zmírnit ohrožení lidského zdraví představuje vývoj antibakteriálního preparátu, který bude působit jen na patogenní bakterie, bez narušení normální bakteriální flóry. Stanou-li se faktory virulence cílem nových léčebných preparátů bude vývoj rezistence bakterií vzácný. Tento předpoklad vychází z toho, že rezistence vůči složkám faktorů virulence se u residentní mikroflóry nemůže vyvinout a šířit, protože tyto bakterie je nemají. Předpokládá se také, že rezistence na látky blokující virulenci mikrobů nejspíše povede ke vzniku nefunkčních systémů virulence, tedy k nevirulentním bakteriím. Bude také jen malý selekční tlak mutací, vznikajících následkem specifické interakce mezi preparátem a faktorem virulence, protože blokátory virulence by měly mít jen malý vliv na růst bakterií.

Stanou se faktory virulence novým cílem léků ?

Nedávné poznatky o faktorech virulence a toxinech bakterií přispěly k pochopení způsobu, jakým patogenní bakterie ovlivňují různé procesy hostitelských buněk ve prospěch svých, ale ke škodě pacienta. Nově se ukázalo, že patogenní bakterie se vyvíjejí souběžně se svými hostiteli a mají pozoruhodně rafinované molekulární mechanismy, často završené vysoce specifickými biochemickými reakcemi mezi mikrobem a cílovou buňkou. Tato detailní znalost může být nyní využita k sestrojení nových antibakteriálních preparátů, které deaktivují mechanismy virulence patogena.

Exaktní definice toho, co je to faktor virulence bakterie, je ještě stále otázkou diskuse. Podle jednoho návrhu by bylo možné patogenní bakterie odlišit od nevirulentních podle přítomnosti genů exprimujících faktory virulence specifické pro vznik infekce a pro překonání obrany hostitele. Přejmenším platí, že faktor virulence je integrovaný multifaktoriální systém, nebo produkt exprimovaný patogenem, nezbytný k tomu, aby se patogen mohl u hostitele replikovat a vyvolat klinicky zjevné syndromy. Pokud by bylo možné tyto faktory virulence neutralizovat pomocí malých organických molekul – blokátorů virulence.- bylo by možné infekci potlačit a imunitní systém by jejího původce odstranil. Tak lze označit zcela novou skupiny antibakteriálních látek s účinkem obdobným antibiotikům.

Podle aktuálních poznatků o mechanismu působení lze faktory virulence rozdělit do několika rozdílných skupin. Jsou to (1) faktory adherence, (2) faktory invazivity, (3) obaly bakterií, (4) exotoxiny a (5) endotoxiny. V mnoha případech vyžadují tyto faktory virulence složité sekreční systémy, které umožňují toxinům či adhesinům být ve vhodné době a na správném místě bakteriální buňky. Jedna specializovaná skupina toxinů vyžaduje mikroinjekci toxinu do cílové buňky pomocí rafinovaného sekrečního systému s názvem „sekreční systém typu III (T3SS)“. Platí to pro řadu Gram-negativních bakterií, působících

nemoci savců, ryb, hmyzu, nebo rostlin. Zatím co mechanismus sekrece III. typu, T3S, je neměnný, toxiny (účinné proteiny) se u různých druhů a kmenů bakterií liší. Toxiny však mají významnou úlohu při interakcích bakterie s hostitelem.

Vyšetření elektronovým mikroskopem odhalila, že T3SS má válcovitou strukturu, která proniká vnitřními i zevními membránami stěny bakterie. Struktura se velmi podobá komplexu bazálního tělíska bičíku. Podobně jako u bičíku duté vlákno polymerizovaného proteinu je zakotveno na zevním povrchu bazálního tělíska, takže mechanismus T3S vypadá jako injekční stříkačka. Obecně se soudí, že efektorové proteiny jsou po kontaktu patogenu s buňkou injikovány cestou T3SS do cytosolu cílové buňky. Efektorové proteiny lze rozdělit na translokátory a efekторы. Translokátory pronikají stěnou cílové buňky tak, že vytvoří v ní otvor, kterým se pak efekторы dostávají do cytosolu. Váží se na specifické hostitelovy proteiny a usměřňují jejich činnost ve prospěch patogenu. Napadená buňka pak např. uniká fagocytóze, která je částí vrozené imunity, a umožňuje replikaci patogenu v lymfatickém systému.

U patogenních yersinií se T3SS nazývá **Ysc** (*Yop secretion*), funkční aparát Ysc tvoří asi 20 ysc genů. Bílkoviny produkované tímto T3SS se jmenují Yops (*zevní bílkoviny Yersinií*) a člení se do dvou tříd – na translokátory a efekторы. Mutanty kteréhokoliv genu Yops jsou zpravidla avirulentní a imunitní systém je likviduje. To znamená, že malé organické molekuly blokující T3S, by mohly inhibovat přenos efektorů a uplatnit se jako antivirulentní preparáty.

Kde najít blokátory virulence ?

Antibiotika se původně hledala u jejich přirozených producentů. Pokrok syntézy organických látek a zavedení kombinatorní chemie posunul oblast hledání antibiotik mezi přírodními zdroji na vývoj více méně synteticky připravených preparátů. Matka Příroda je však vynalézavější než syntetická chemie při vzniku nových odlišných látek. Pravděpodobně pátrání po nových antibakteriálních preparátech, včetně blokátorů virulence, bude zaměřeno na přírodní i syntetické sloučeniny.

Předpokládané využití blokátorů virulence u T3SS

Většinu nozokomiálních nákaz (NN) – asi 70 %- nejspíše vyvolávají bakterie rezistentní nejméně proti jednomu běžně užívanému léku. Nemocniční epidemie NN působené Gram-negativními patogeny nejčastěji vznikají u pacientů na jednotkách intenzivní péče, u pacientů operovaných a dlouhodobě upoutaných na lůžko (pneumonie). Jejich původci zpravidla jsou *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. a *Escherichia coli*.

Pacienti s cystickou fibrózou jsou brzy kolonizováni *Pseudomonas aeruginosa*., rezistentní na řadu antibiotik. To vede k těžkým komplikacím s opakovanými atakami infekce plic. *Ps. aeruginosa* využívá při své patogenitě jak mechanismu T3S, tak bičíků.

Mezi původce střevních infekcí, využívající T3SS, patří na celém světě shigely, salmonely, enteropatogení *E. coli* a yersinie. Od poloviny 80. let 20. století prudce roste podíl izolovaných rezistentních shigel, který dnes dosahuje víc než 80 %. Blokátory virulence by mohly být využívány i profylakticky k prevenci epidemií průjemových onemocnění, např. v oblastech po záplavách. Výhodou je i malé nebezpečí vzniku rezistence na tyto blokátory.

Chlamydia pneumoniae je dnes běžným původcem komunitních respiračních infekcí. Styk s tímto mikroblem je mimořádně častý, většina lidí prožívá opakované, jím vyvolané infekce. Odhaduje se, že *Ch. pneumoniae* působí asi 10 % komunálně získaných pneumonií a 5 % bronchitid.

V epidemiologických studiích byla prokázána souvislost mezi infekcí *Ch. pneumoniae* a patogenezí různých zánětlivých procesů, např. aterosklerózy. Řada experimentů na zvířatech naznačuje, že *Ch. pneumoniae* může pronikat do stěny cév, vyvolat zánět a navodit, nebo podpořit, vznik aterosklerotických lézí. Dosud však chybí jednoznačný důkaz toho, že *Ch.*

pneumoniae má u kardiovaskulárních nemocí významný patogenní vliv. Blokátory virulence, na něž by jen vzácně mohla vzniknout rezistence, by byly vhodné pro dlouhodobé klinické studie mající za cíl objasnit možnou úlohu *Ch. pneumoniae* v patogenezi kardiovaskulárních nemocí.

Salmonella enteritica je představována velkou skupinou úzce příbuzných patogenních bakterií, vyvolávajících lehké gastroenteritidy až těžká onemocnění lidí i zvířat. Jejich patogenita těsně souvisí se dvěma samostatnými systémy T3S, tj. invazivním systémem SPI-1 a se systémem SPI-2, umožňujícím intracelulární replikaci. Skupina *Sal. enteritica* je rezistentní na řadu antibiotik, takže blokátory virulence mohou být při léčení jí vyvolaných infekcí velmi užitečné.

Nelze pominout možnost využití blokátorů virulence v prevenci trachomu nebo sexuálně přenosných infekcí, čímž by se značně snížila spotřeba antibiotik a následně i šíření rezistence na antibiotika.

Inhibitory T3SS

Kauppi a spol. na základě vlastních studií popsali tři různé inhibitory: salicylideacylhydrazidy, salicylanilidy a sulfonaminobenzanilidy. Všechny blokují přenos signálu z genu i aktuální systém T3S efektorového proteinu. Důležité je, že inhibice T3SS byla pozorována při takových koncentracích inhibitorů, které jen slabě nebo středně ovlivňovaly růst bakterie.

Ukázalo se, že T3SS inhibitory brání intracelulárnímu růstu *Ch. trachomatis*, *Ch. pneumoniae* a dalších, neovlivnily však růst *Coxiella burnetti*, dalšího intracelulárního patogenu, který nemá T3SS. Jediná dosud publikovaná studie naznačuje, že T3SS inhibitory mohou ovlivňovat virulenci bakterií také *in vivo* a tím zmírňovat klinický průběh nemoci. Je však nutné v dalších studiích ověřit potřebnou koncentraci, stabilitu a toxicitu blokátorů virulence na cílových místech živého organismu.

Je zřejmé, že salicylidacylhydrazidy dokáží inhibovat T3SS mnoha druhů bakterií a jsou proto slibným základem vývoje nových léků.

Závěr

Vznik a šíření multirezistentních bakterií představuje závažný, celosvětový, zdravotnický problém. I když byla antibiotika označována jako „záračné léky“, které zachránily miliony nemocných, rezistence na klasická antibiotika je stále častější a léčba bakteriálních infekcí je stále těžší. Antibakteriální preparáty s novým mechanismem působení, odlišným od tradičních antibiotik, představují dosud nenaplněnou potřebu současné medicíny.

Jeden z nových postupů boje s bakteriemi může být zaměřen proti jejich virulenci. Umožnil jej významný pokrok poznání patogenese bakterií v posledních letech. Slibným cílem pro potlačování virulence různých Gram-negativních bakterií je jejich systém T3S, který v roce 1994 objevil Wolf-Watz se spolupracovníky. T3S se přímo podílí na přenosu proteinů virulence do eukaryotických buněk. Analýza mutant T3S ukázala, že pro virulenci je nezbytný sekreční systém T3SS a že blokáda sekrece stačí ke změně patogenní bakterie na benigní bakterii. Proto představuje systém T3SS vhodný model pro vyhledávání látek s antivirulentním účinkem, které by se mohly stát alternativou antibiotik. Podařilo se najít inhibitory T3SS, z nichž dosud nejslibnější se jeví salicylidacylhydrazidy. Je možné, že se podaří najít látky potlačující virulenci, blokuující adhezi, invazi, sekreci proteinu a jeho přenos, tvorbu obalu bakterií i aktivitu jejich exotoxinů a endotoxinů, které bude možné užít jako nové antibakteriální léky.