

**Dr n. biol. Anna Grzegorzewicz**

**Streszczenie wykładu**

## **LEKI PRZECIWGRUŻLICZE O NOWYCH MECHANIZMACH DZIAŁANIA**

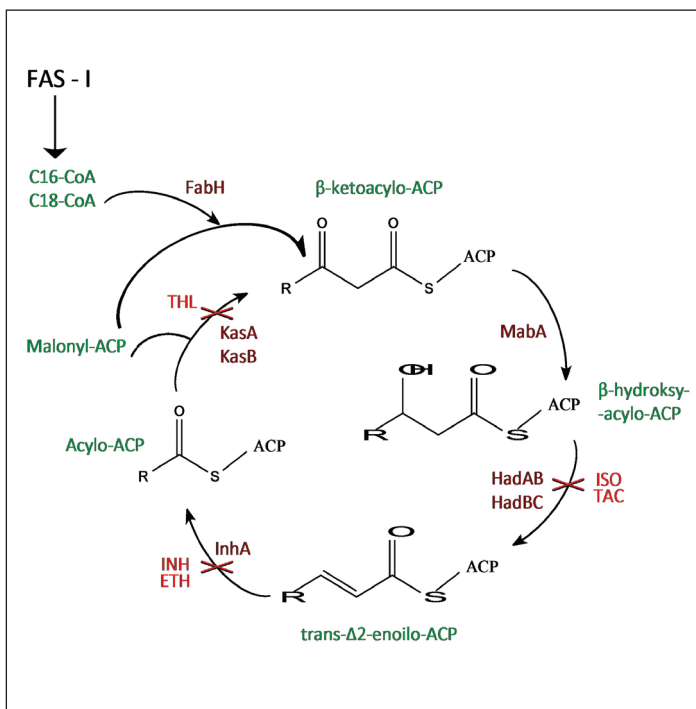
Gruźlica należy do najbardziej rozpowszechnionych chorób zakaźnych na Ziemi. Mimo dostępności skutecznej terapii, ocenia się, że rocznie choruje na nią około 9 milionów osób, a umiera 1,5 miliona. W Polsce jest ona chorobą zanikającą. W ostatniej dekadzie liczba przypadków gruźlicy w naszym kraju zmniejszyła się o 30%, ciągle jednak jest wyższa niż w innych krajach Unii Europejskiej (13, 21).

Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest prątek gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), zidentyfikowany przez Roberta Kocha w 1882 roku. Gruźlica przenosi się przede wszystkim drogą kropelkową. Prątki lokalizują się w pęcherzykach płucnych i makrofagach. W wyniku uruchomienia mechanizmów obronnych dochodzi do samoograniczenia zakażenia poprzez utworzenie typowych dla gruźlicy ziarniaków, w których prątki mogą przetrwać w stanie uśpienia przez wiele lat. Zakażenie zatem nie jest równoznaczne z rozwinięciem aktywnej choroby i może pozostawać bezobjawowe. Tylko około 10% osób zakażonych zachoruje, w tym 5% w okresie dwóch lat od zetknięcia się z prątkiem gruźlicy. Czynniki sprzyjającymi uaktywnieniu się choroby są między innymi: zakażenie wirusem HIV, choroby nowotworowe, cukrzyca, niedożywienie, alkoholizm, młody lub zaawansowany wiek zakażonego (14).

Pierwszy skuteczny lek przeciwko gruźlicy – streptomycynę – wprowadzono dopiero po II wojnie światowej. Bardzo szybko jednak pojawiły się szczepy prątka odporne na ten antybiotyk i leczenie nie przynosiło oczekiwanych efektów. Już wtedy zaobserwowano, że prątek gruźlicy ma niezwykłą łatwość nabywania oporności. Dlatego właśnie w celu osiągnięcia pozytywnych efektów terapeutycznych niezbędne jest zastosowanie terapii wielolekowej. Wynalezienie w latach 50. i 60. XX wieku kolejnych antybiotyków: izoniazydu, etambutolu, rifampicyny, pyrazinamidu i etionamidu pozwoliło na opracowanie skutecznej terapii przeciwgruźliczej. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej wymaga zastosowania dodatkowych antybiotyków, między innymi z grupy aminoglikozydów, chinolonów i polipeptydów (14, 22).

Istnieje kilka przyczyn wysokiej śmiertelności spowodowanej gruźlicą. Stosowana obecnie szczepionka BCG ma ograniczoną skuteczność, ponieważ nie zapobiega zakażeniu, a jedynie łagodzi przebieg choroby u dzieci (1).

Jednym z podstawowych problemów jest długość trwania terapii przeciwgruźliczej. Gruźlica lekowrażliwa leczona jest przez okres od 6 do 9 miesięcy. W wypadku gruźlicy wielolekoopornej terapia warunkująca całkowite wyleczenie trwa od 18 do 24 miesięcy. Leki przeciwgruźlicze mają często działanie niepożądane, uniemożliwiające normalne funkcjonowanie chorego. Z tego względu pacjenci przerywają terapię, co z kolei przyczynia się do powstania szczepów lekoopornych.



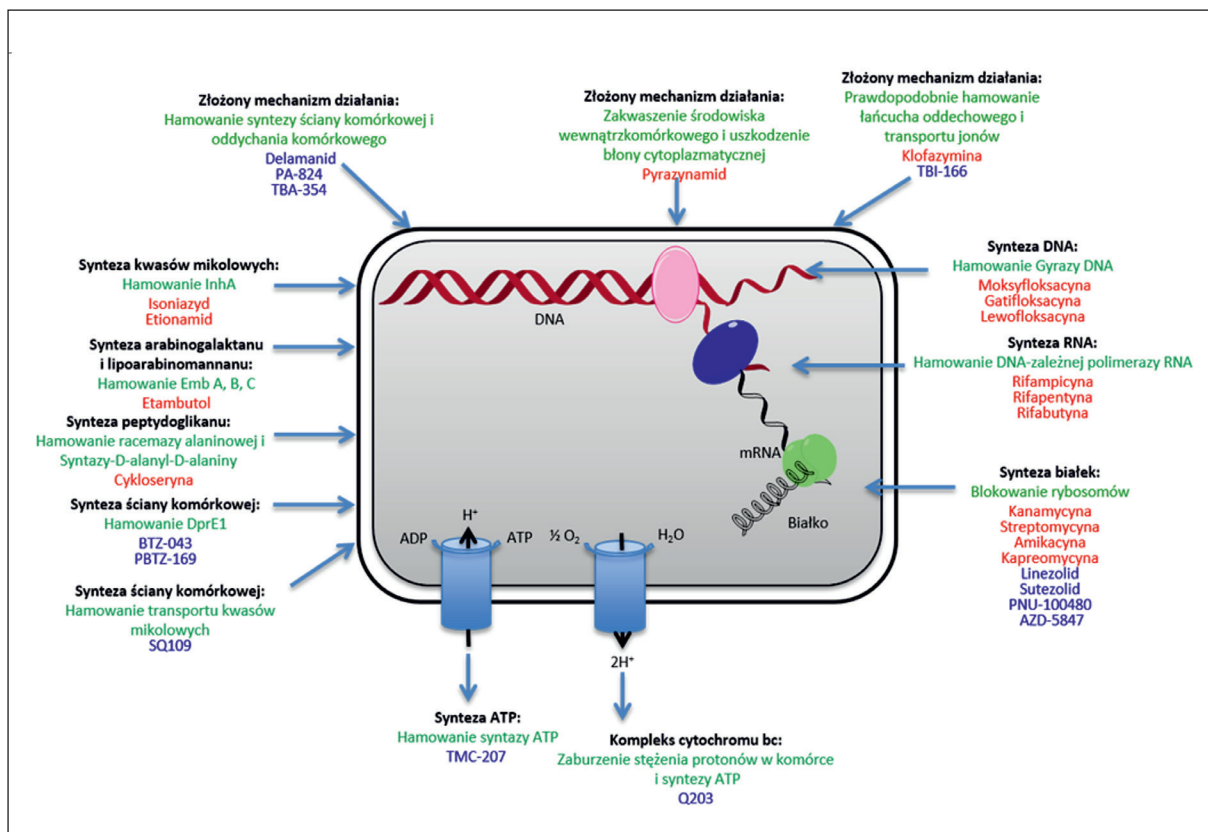
Rys. 1. Cykl elongacji kwasów mikołowych przeprowadzany przez kompleks syntazy kwasów tłuszczowych II (FAS II) oraz miejsca działania w nim leków przeciwprątkowych. Substratami systemu FAS II są malonyl-ACP i acylo-CoA (C16-C26) produkt systemu FAS I. Pierwsza reakcja w systemie FAS II, katalizowana przez białko FabH prowadzi do powstania  $\beta$ -ketoacylo-ACP, który następnie ulega redukcji w reakcji katalizowanej przez enzym MabA. Utworzony  $\beta$ -hydroksoacylo-ACP jest następnie odwadniany przy udziale dehydrataz HadAB i HadBC i redukowany przez reduktazę enoilo-ACP (InhA). W kolejnym etapie KasA lub KasB katalizują reakcję kondensacji acylo-ACP z malonyl-S-ACP inicjując w ten sposób kolejny cykl elongacji. Isoniazyd (INH) i etionamid (ETH) są inhibitorami InhA. ISO I TAC hamują etap dehydratacji. Tio-laktomycyna (THL) działa na KasA.

Stosowanie terapii wielolekowej w leczeniu gruźlicy nie wynika jedynie z łatwości nabywania przez tę bakterię oporności. Prątki znajdujące się w płucach nie stanowią jednolitej populacji. Można wyróżnić prątki aktywnie namnażające się oraz będące w stanie uśpienia. Dlatego niezbędne jest stosowanie antybiotyków o różnych mechanizmach molekularnych, działających na różne ich populacje.

W ostatnich latach obserwuje się wzrastającą zapadalność na wielolekooporną gruźlicę z opornością co najmniej na rifampicynę i isoniazyd (MDR-TB, *multidrug resistant tuberculosis*) oraz gruźlicę z lekoopornością wielolekową (XDR-TB, *extensively drug resistant tuberculosis*) o rozszerzonej oporności prątków na rifampicynę, isoniazyd, chinolony oraz aminoglikozydy. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej jest długie, kosztowne i bardzo często kończy się niepowodzeniem. Kolejnym problemem są interakcje pomiędzy lekami antywirusowymi, stosowanymi u chorych zakażonych wirusem HIV, a lekami przeciwgruźliczymi (14, 22).

Zdolność do przetrwania prątka wewnątrz makrofagów wynika z jego niezwyklej budowy osłon komórkowych. Szkielet ich ściany komórkowej tworzy kompleks peptidoglikan-arabino-galaktan, estryfikowany przez kwasy mikołowe. Ze szkieletem są związane inne składniki ściany komórkowej, przede wszystkim lipidy i glikokoniugaty. Zewnętrzną, kontaktującą się ze środowiskiem warstwę, stanowi otoczka zbudowana z polisacharydów oraz mniejszej ilości białek i lipidów.

Znamienną cechą osłon komórkowych prątków jest bogactwo lipidów i glikokoniugatów o unikatowej strukturze, znajdujących się zarówno w błonie cytoplazmatycznej, jak i w zewnętrznych warstwach osłon komórkowych (5, 9). Przykładem są wyżej wspomniane kwasy mikołowe, które są długołańcuchowymi,  $\alpha$ -hydrokso,  $\beta$ -alkilo kwasami tłuszczowymi. Wyróżniamy trzy główne typy kwasów mikołowych  $\alpha$ -, keto- i metoksymikołany. Synteza kwasów tłuszczowych, w tym kwasów mikołowych, u prątków jest przeprowadzana przez dwa systemy. W pierwszym z nich, syntaza kwasów tłuszczowych typu I (FAS I, *Fatty acid synthase I*) dostarcza kwasów tłuszczowych o średniej długości (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>), natomiast w drugim syntaza kwasów tłuszczowych

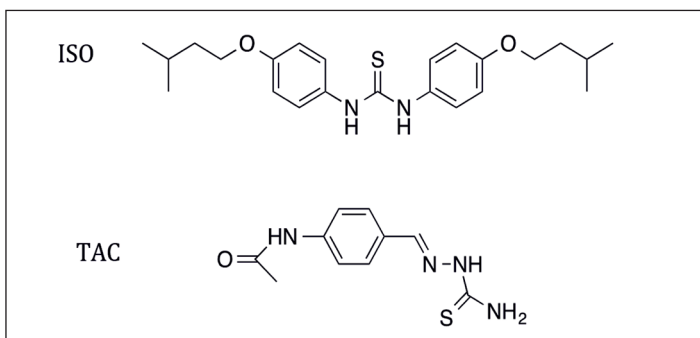


Rys. 2. Mechanizm działania obecnie stosowanych leków przeciwprątkowych (w kolorze czerwonym) oraz leków będących w fazie badań klinicznych (w kolorze niebieskim).

typu II (FAS II, *Fatty acid synthase II*) jest odpowiedzialna za syntezę kwasu tłuszczowych o długości do 60 atomów węgla (Rys. 1) (20).

Kwasy mikołowe są nie tylko ważnym składnikiem ściany komórkowej, ale również biorą udział w interakcjach z układem immunologicznym gospodarza. Nie jest zatem zaskoczeniem, że jeden z najbardziej skutecznych leków przeciwgruźliczych, izoniazyd, działa właśnie na syntezę kwasów mikołowych. Przez wiele lat starano się poznać mechanizm działania tego leku. Obecnie wiadomo, że hamuje on reduktazę enoilo-ACP (InhA), enzymu wchodzącego w skład systemu FAS II (6, 17). Działanie przeciwbakteryjne poprzez hamowanie InhA wywiera również etionamid, ale odznacza się on mniejszą skutecznością niż izoniazyd (2). Isoniazyd i etionamid oddziałują przede wszystkim na prątki aktywnie namnażające się. Etambutol hamuje syntezę arabinianowej składowej arabinogalaktanu i lipoarabinomannanu (15, 19). Rifampicyna, poprzez hamowanie DNA-zależnej RNA polimerazy, blokuje proces transkrypcji, dlatego zabija również bakterie o niskiej aktywności metabolicznej. Aminoglikozydy, do których należy streptomycyna, zakłócają syntezę białek (11). Mechanizm działania obecnie stosowanych leków przeciwgruźliczych oraz leków będących w fazie badań klinicznych został przedstawiony na rysunkach 1 i 2.

W celu zmniejszenia przypadków gruźlicy potrzebne są skuteczniejsze leki o nowych mechanizmach działania, działające zarówno na prątki aktywnie się namnażające, jak również będące w stanie uśpienia. Niezbędne byłoby także skrócenie leczenia przynajmniej do dwóch miesięcy, jak i zmniejszenie częstości podawania leków. Nowe leki powinny być także kompatybilne z terapią antywirusową.



Rys. 3. Struktura chemiczna izoksylu i tiocetazonu

Oprócz poszukiwania nowych związków prątkobójczych prowadzone są również badania, których celem jest poznanie mechanizmu działania znanych już leków przeciwgruźliczych. Dogłębne jego zrozumienie pozwoli na opracowanie leków o podobnej skuteczności, ale odznaczających się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi oraz mniejszą toksycznością.

Izoksyl (ISO) i tiocetazon (TAC) są to leki (Rys. 3), które były stosowane w leczeniu gruźlicy w latach 70. i 80. XX wieku w Afryce i Ameryce Łacińskiej. Ze względu na szereg działań niepożądanych, występujących przy ich przyjmowaniu, oraz wskutek pojawienia się szczepów na nie opornych, wycofano je z użycia (4). Obydwa te związki, będące tiomocznikami, są prolekami wymagającymi aktywacji przez monooxygenazę prątków EthA (7, 12). Ich aktywna forma, posiadająca działanie bakteriobójcze, nie była do tej pory znana. Przez wiele lat było wiadomo, że ISO i TAC hamują syntezę kwasów mikołowych, ale enzym, na który działają nie został do tej pory zidentyfikowany (16). W celu wyjaśnienia mechanizmu działania ISO i TAC zostały zastosowane metody biochemiczne i metody biologii molekularnej. Identyfikacja enzymu, który jest hamowany przez dany związek, odbywa się poprzez próbę izolacji opornych mutantów. Następnie, celem zlokalizowania mutacji warunkującej oporność, wykonuje się sekwencjonowanie całego genomu lub poszczególnych genów. Taką metodę zastosowano w celu poznania enzymu lub enzymów hamowanych przez oba leki. Wyizolowano bakterie prątka odporne na ISO i TAC, w których stwierdzono obecność mutacji w operonie, na który składają trzy geny *hadA*, *hadB* i *hadC* (3, 10). Geny te kodują dehydratazę  $\beta$ -hydroksyacylu, enzym, który katalizuje etap dehydratacji  $\beta$ -hydroksyacylu-ACP w systemie FAS II (Rys. 1). Białko HadB, posiadające centrum katalityczne, tworzy heterodimer z HadA lub HadC. Heterodimer HadAB jest odpowiedzialny za syntezę krótszych kwasów mikołowych, podczas gdy heterodimer HadBC katalizuje powstanie dłuższych kwasów mikołowych (18). W kolejnym etapie badań dokonano nadekspresji genów z operonu *hadABC*. Nadekspresja kombinacji genów *hadAB* lub *hadBC* warunkowała oporność bakterii na ISO i TAC. Jednocześnie nadekspresja innych genów, należących do systemu FAS II, takich jak *inhA*, *kasA*, *mabA* nie zmieniała wrażliwości bakterii na oba leki. Wyniki te potwierdziły, że enzym kodowany przez geny *hadABC* jest hamowany przez ISO i TAC (3, 10).

Powyższe wyniki, uzyskane metodami biologii molekularnej, zostały również potwierdzone za pomocą spektrometrii masowej. Aktywnie rosnące bakterie prątka inkubowano z ISO lub TAC. Następnie metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GC-MS) lub cieczowej (LC-MS) sprzężonej ze spektrometrią masową wykonano analizę kwasów tłuszczowych, która wykazała akumulację 3-hydroksy  $C_{18}$ - $C_{22}$  kwasów tłuszczowych, wskazując na zahamowanie etapu dehydratacji w systemie FAS II (10).

Na tym etapie badań trudno było stwierdzić, w jaki sposób ISO i TAC hamują dehydratazę. Może się to odbywać poprzez bezpośrednie wiązanie inhibitora z enzymem lub, zakładając bardziej skomplikowany mechanizm, poprzez zaburzenie interakcji pomiędzy białkami w systemie FAS II.

Najczęściej pojawiającą się mutacją u szczepów wykazujących oporność na ISO i TAC, była niesynonimiczna mutacja punktowa w genie *hadA*, zmieniająca cysteinę na serynę (C61S) (10).

Wysunięto hipotezę, że grupa tiomocznikowa ISO i TAC wiąże się kowalencyjnie z cysteiną białka HadA. Próby udowodnienia tej hipotezy w systemie *in vitro*, w którym inkubowano oczyszczone białka HadA z ISO lub TAC, nie powiodły się, prawdopodobnie ze względu na brak prawidłowej aktywacji obydwu leków, do której wymagana jest obecność wspomnianej wcześniej monoooksygenazy EthA. Skonstruowano szczep *Mycobacterium bovis* BCG syntetyzujący białko HadA i poddano go działaniu ISO lub TAC, a następnie wyizolowano i oczyszczono białko HadA, które zanalizowano metodami spektrometrii masowej. Wykazano kowalencyjne wiązanie się ISO lub TAC poprzez mostek dwusiarczkowy z cysteiną białka HadA (8). Przewagą systemu, w którym jako gospodarza użyto *M. bovis* BCG, była obecność u tej bakterii monoooksygenazy EthA, aktywatora obu związków. Wiązanie ISO lub TAC do cysteiny białka HadA najprawdopodobniej blokuje dostęp substratu do kanału wiążącego jego część acylową, znajdującego się na pograniczu białek HadA i HadB. W wyniku zahamowania aktywności dehydrataz zostaje przerwana synteza kwasów mikołowych, a rezultatem jest śmierć komórki bakteryjnej. Badania te również dostarczyły informacji na temat aktywnych form ISO i TAC, które są ich pochodnymi sulfonowymi.

Jednym z podstawowych problemów przy stosowaniu ISO i TAC było powstawanie szczepów opornych z mutacją w genie *ethA*, odpowiedzialnym za aktywację obu proleków. Dzięki poznaniu aktywnej formy ISO i TAC można zaprojektować leki, które nie wymagałyby etapu aktywacji, omijając w ten sposób możliwość powstania szczepów opornych. Powyżej opisane odkrycia powinny pomóc w syntezie nowych inhibitorów etapu dehydratacji.

Opracowanie nowych leków przeciwgruźliczych jest niezwykle długotrwałym procesem, dlatego próby zrozumienia mechanizmu działania już sprawdzonych i skutecznych leków, w celu opracowania ich odpowiedników o lepszych właściwościach farmakokinetycznych i mniejszej toksyczności, wydają się być odpowiednim podejściem.

## Piśmiennictwo

1. Aagaard C., Dietrich J., Doherty M., Andersen P.: TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunol. Cell Biol.*, 2009; 87: 279–286.
2. Baulard A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., McAdam R.A., Brennan P.J., Lochter C., Besra G.S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem.* 2000; 275: 28326–28331.
3. Belardinelli J.M., Morbidoni H.R. Mutations in the essential FAS II  $\beta$ -hydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Mol Microbiol.* 2012; 86: 568–579.
4. Belardinelli J.M., Morbidoni H.R. Recycling and refurbishing old antitubercular drugs: the encouraging case of inhibitors of mycolic acid biosynthesis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11: 429–440.
5. Brennan PJ, Crick DC. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7: 475–488.
6. Dessen A., Quémard A., Blanchard J.S., Jacobs W.R. Jr, Sacchettini JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1995; 17: 1638–1641.
7. Dover L.G., Alahari A., Gratraud P., Gomes J.M., Bhowruth V., Reynolds R.C., Besra G.S., Kremer L. EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrob Agents Chemother.* 200; 51: 1055–1063.

8. Grzegorzewicz A.E., Eynard N., Quémard A., North J.E., Margolis A., Lindenberger J.J., Jones V., Korduláková J., Brennan P.J., Lee R.E., Ronning D.R., McNeil M.R., Jackson M. Covalent Modification of the Mycobacterium tuberculosis FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. *ACS Infect. Dis.* 2015, 1: 91–97.
9. Grzegorzewicz A.E., Jackson M. Subfractionation and analysis of the cell envelope (lipo) polysaccharides of Mycobacterium tuberculosis. *Methods Mol Biol.* 2013; 966: 309–324.
10. Grzegorzewicz A.E., Korduláková J., Jones V., Born S.E., Belardinelli J.M., Vaquié A., Gundi V.A., Madacki J., Slama N., Laval F., Vaubourgeix J., Crew R.M., Gicquel B., Daffé M., Morbidoni H.R., Brennan P.J., Quémard A., McNeil M.R., Jackson M. A common mechanism of inhibition of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *J Biol Chem.* 2012; 287: 38434–38441.
11. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 423–435.
12. Korduláková J., Janin Y.L., Liav A., Barilone N., Dos Vultos T., Rauzier J., Brennan P.J., Gicquel B., Jackson M. Isoxyl activation is required for bacteriostatic activity against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 3824–9.
13. Korzeniewska-Koseła M. Tuberculosis in Poland in 2010. *Przegl Epidemiol.* 2012; 66: 329–334.
14. Michałowska-Mitczuk D. Farmakoterapia gruźlicy. *Postępy Farmakoterapii.* 2009; 65: 51–58.
15. Mikusová K., Slayden R.A., Besra G.S., Brennan P.J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 2484–2489.
16. Phetsuksiri B., Baulard A.R., Cooper A.M., Minnikin D.E., Douglas J.D., Besra G.S., Brennan P.J. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1042–1051.
17. Quémard A., Sacchetti J.C., Dessen A., Vilcheze C., Bittman R., Jacobs W.R. Jr, Blanchard J.S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry.* 1995; 34: 8235–8241.
18. Sacco E., Covarrubias A.S., O'Hare H.M., Carroll P., Eynard N., Jones T.A., Parish T., Daffé M., Bäckbro K., Quémard A. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 14628–14633.
19. Takayama K., Kilburn J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 1493–1499.
20. Takayama K., Wang C., Besra G.S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 81–101.
21. World Health Organization. Global tuberculosis report. WHO Report 2014, Geneva.
22. Zumla A.I., Gillespie S.H., Hoelscher M., Philips P.P., Cole S.T., Abubakar I., McHugh T.D., Schito M., Maeurer M., Nunn A.J. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14: 327–340.