



Reaktywne formy tlenu (RFT) indukowane w komórkach bakterii stresem związanym z działaniem antybiotyków stanowią istotną komponentę bakteriobójczego działania różnych klas antybiotyków

Reactive Oxygen Species (ROS) are involved in antibiotics – induced bacterial cell death

Adam Jaworski¹, Ireneusz Jurczyk¹, Katarzyna Dudek¹

¹ Społeczna Akademia Nauk

¹ University of Social Sciences, Łódź, Poland

Streszczenie

W świetle danych literatury światowej z ostatnich kilku lat lepsze, głębsze zrozumienie złożonej odpowiedzi komórek bakterii na stres związany ze specyficznym, molekularnym mechanizmem działania różnych antybiotyków na określone struktury i procesy komórkowe wydaje się kluczem do opracowania sposobów zwiększenia antybakteryjnej aktywności i terapeutycznej skuteczności stosowanych obecnie antybiotyków. W artykule uwaga została skoncentrowana na powszechnie stosowanych antybiotykach należących do trzech różnych klas – β -laktamowych (ampicylina), glikozydowych (gentamycyna) i fluorochinolowych (norfloksacylina) – które niezależnie od ich specyficznego mechanizmu działania na określone, dobrze poznane tarcze molekularne indukują stres oksydacyjny i syntezę reaktywnych form tlenu (RFT). Reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*), syntetyzowane w różnych szlakach metabolicznych redukcji i utleniania komórkowego, stanowią bardzo istotną, dodatkową komponentę bójczego działania antybiotyków na komórki różnych gatunków bakterii. W artykule przedstawiamy także bardzo dobrze udokumentowane dane dowodzące, że antyoksydanty, „zmiatacze” rodników tlenowych oraz białka ochronne indukowane stresem oksyda-

cyjnym związanym z działaniem antybiotyków chronią komórki bakterii przed śmiercią, a więc bardzo znacząco obniżają skuteczność antybiotykoterapii chorób infekcyjnych.

Abstract

In the light of new data from the world literature, a better and more profound understanding of the complexity of bacterial cells' response to stress related to specific molecular mechanisms of different antibiotics' activity on the structures and cellular processes, appears to be a key to the development of strategies increasing antibacterial activity and therapeutic efficacy of the antibiotics being in use today. The article focuses on three different groups of commonly used antibiotics (β -lactams, aminoglycosides and fluoroquinolons) which regardless of their specific mechanisms of action on certain, well-known molecular targets induce oxidative stress and synthesis of reactive oxygen species. Reactive oxygen species synthesized in metabolic redox pathways constitute an important additional component of several antibiotics antibacterial activity against different species of bacterial. The article presents also very well documented data, proving that antioxidants, scavengers of oxygen radicals as well as repair proteins induced by oxidative stress generated by antibiotics protect bacterial cells against death thus significantly decrease the effectiveness of antibiotic therapies used in infectious diseases treatment.

Key words

reactive oxygen species (ROS), antibiotics, bacterial response to antibiotics - induced lethal stress, new model for antibiotics lethality

Narastająca oporność bakterii na antybiotyki w połączeniu z ograniczoną liczbą nowych antybiotyków wprowadzanych do terapii chorób infekcyjnych kreuje współcześnie globalny problem dla zdrowia publicznego [1, 2, 3, 4, 5]. Ze względu na biologiczne skutki działania różnych antybiotyków na bakterie dzieli się je zwykle na dwie grupy: związki o działaniu bakteriostatycznym (hamujące wzrost komórek) i bakteriobójczym (prowadzące do śmierci komórek). Wśród antybiotyków o działaniu bakteriobójczym wyróżniało się zwykle trzy klasy tych związków ze względu na specyficzny, molekularny mechanizm ich działania na struktury i procesy komórkowe bakterii: inhibitory syntezy ściany komórkowej, inhibitory replikacji DNA oraz inhibitory biosyntezy białek [6].

Jednak w ostatniej dekadzie narasta wiedza na temat nowego szlaku, wspólnego dla tych trzech klas antybiotyków, generującego w warunkach tlenowych reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*, ROS), które mają, jak się sądzi, znaczący udział w zabijaniu zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich [7, 8, 9, 10]. Poziom syntezy i aktywności reaktywnych form tlenu takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy (*superoxide anion*), nadtlenek wodoru (*hydrogen peroxide*) i rodnik hydroksylowy (*hydroxyl radicals*), ubocznych produktów metabolizmu tlenowego organizmów żywych podlega w komórkach ścisłej kontroli poprzez syntezę, z jednej strony, katalaz i dysmutaz enzymów detoksyfikujących RFT, z drugiej strony, poprzez dwuskładnikowe systemy regulatorowe, odpowiedzi komórkowej na stresi (SoxRS, OxyRS, SOS), które kontrolują rodzaj i poziom uszkodzeń dokonanych w komórkach przez reaktywne formy tlenu i inne genotoksyczne czynniki [11, 12, 13]. Ustalenie wszystkich źródeł i mechanizmów syntezy całej puli reaktywnych form tlenu produkowanych przez komórki bakterii, w tym przez komórki modelowych szczepów *Escherichia coli*, nie jest łatwe, a opisywane w wielu pracach wyniki są często niepewne z powodu ogromnego arsenału potencjalnych generatorów ROS w komórkach bakterii. RFT potencjalnie mogą być produkowane we wszystkich reakcjach utleniania, kiedy tlen przyjmuje elektrony ze zredukowanych flavin, chinolonów oraz z funkcjonalnych grup różnych innych związków [14]. W szlakach metabolizmu komórek *E. coli* funkcjonują w różnych szlakach metabolicznych 133 enzymy i reakcje utleniania, w których potencjalnie mogą być generowane ROS. Liczba tych reakcji jest porównywalna z liczbą reakcji, w których syntetyzowana jest komórkowa pula ATP/ADP, NAD/NADH i NADP/

NADP. Nie ma więc wątpliwości, że RFT odgrywają bardzo istotną, zintegrowaną rolę w całym metabolizmie bakterii. Najogólniej można powiedzieć, że każda hiperaktywacja łańcucha transportu elektronów indukuje w komórce syntezę rodników tlenowych takich jak anionorodnik nadtlenukowy i rodnik hydroksylowy. Podczas reakcji Fentona nadtlenuk wodoru, reagując z jonem żelazowym (Fe^{2+}), generuje powstawanie rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$), jonu wodorotlenkowego (OH^-) oraz jonu żelazowego (Fe^{3+}).

Rodniki hydroksylowe są najsilniejszym reaktywnym czynnikiem utleniającym różne klasy molekuł i makromolekuł komórkowych, w tym generującym bezpośrednio zarówno uszkodzenia oksydacyjne genomowego DNA, jak i uszkodzenia oksydacyjne puli komórkowych nukleotydów GTP i ATP [15, 16, 17, 18, 19]. Postawiono interesującą hipotezę, że uszkodzenia oksydacyjne nukleotydów guanylowego, adenylowego, z wytworzeniem w puli komórkowej odpowiednio 8-oxo-dGTP i 8-oxo-dATP, a następnie ich inkorporacja do DNA mogą mieć znaczący udział w bójącym działaniu trzech różnych klas antybiotyków: β -laktamowych (inhibitory syntezy ściany komórkowej), chinolinowych (inhibitory gyrazy, a w efekcie replikacji DNA), aminoglikozydowych (inhibitory syntezy białek) [10]. Hipotezę testowano na modelu *E. coli*. W badaniach oceniano, po pierwsze, wpływ trzech białek naprawczych zwanych w literaturze angielskiej *sanitizers*, z których dwa są glikozylazami DNA MutM i MutY, inicjującymi system BER, który usuwa uszkodzone nukleotydy guanylowe [20], trzecie zaś jest nukleotydazą MutT, która hydrolizuje 8-oxo-dGTP do 8-oxo-dGMP i pirofosforanu [21, 22]. Po drugie, zbadano udział polimeraz DNA – PolI, PolII, PolIV i PolV – w inkorporacji uszkodzonych nukleotydów guanylowych do genomowego DNA poprzez pomiar stopnia śmiertelności populacji komórek w warunkach działania badanych antybiotyków [23]. Uzyskane wyniki i sformułowane, jak się wydawało, w pełni uprawnione wnioski płynące z badań przeprowadzonych w różnych układach izogenicznych szczepów dzikich i mutantów *E. coli* były niezwykle interesujące, a nawet zaskakujące. I tak okazało się, że nadprodukcja glikozylazy MutT (sanitizer 8-oxo-dGTP), przy równoczesnej delekcji genów *mutM* i *mutY* – chroni komórki bakterii przed bójącym działaniem antybiotyków chinolinowych o rząd lub dwa rzędy wielkości i w nieco mniejszym stopniu także przed działaniem antybiotyków β -laktamowych i aminoglikozydowych [10]. Autorzy cytowanej pracy wnio-

skują, że obecna w komórkach pula uszkodzonego nukleotydu 8-oxo-dGTP, generowanego przez rodniki tlenowe pod wpływem działania antybiotyków, inkorporowana przez polimerazy DNA PolIV i PolV do *de novo* syntetyzowanego DNA prowadzi do pojawiania się licznych podwójnych pęknięć DNA (DSBs), które w porę nienaprawione przez systemy BER oraz RecA i RecBCD zależnej naprawy homologicznej rekombinacji (HR) indukują kaskadę zdarzeń prowadzącą do apoptotycznej śmierci komórek [23]. Intrygującym odkryciem wydaje się to, że protekcja komórek przed bójczym działaniem antybiotyków przez nukleoazydazę MuT jest związana nie tylko z degradacją puli 8-oxo-dGTP, lecz także puli rybonukleotydu 8-oxo-rGTP [24]. Okazało się bowiem, że polimeraza RNA łatwo inkorporuje 8-oxo-rGTP do transkryptów, co skutkuje zaburzeniami w strukturze rRNA i tRNA, a w efekcie w syntezie prawidłowych białek [25, 26]. Na podstawie uzyskanych wyników postawiono ważny wniosek, że wrażliwość bakterii na wszystkie trzy klasy antybiotyków można by znacząco zwiększyć poprzez zahamowanie syntezy lub enzymatycznej aktywności białek MutT (degradacja 8-oxo-dGTP) oraz MutM i MuY (inicjacja systemu BER), a także inaktywację na poziomie genów lub produktów systemu naprawy HR [10]. Autorzy cytowanych prac zakładają, że uda się opracować związki chemiczne, które stosowane w antybiotykoterapii w postaci specyficznych adiuwantów będą blokować białka naprawiające oksydacyjne uszkodzenia DNA i dwuniciowe pęknięcia (dsDNA), a także indukować syntezę polimeraz DNA (PolIV i PolV) inkorporujących uszkodzone nukleotydy do genomowego DNA. Nie dziwi więc fakt, że komentowane badania i uzyskane wyniki oraz sformułowane daleko idące wnioski i sugestie spotkały się z jednej strony z dużym zainteresowaniem, a z drugiej strony wzbudziły kontrowersyjną dyskusję wśród specjalistów. Ostatnio ukazały się w literaturze naukowej kolejne ważne prace doświadczalne dotyczące tej tematyki, zatytułowane: „Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species”, „Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species”. Autorzy tych prac negują udział rodników tlenowych w bakteriostatycznym i bakteriobójczym działaniu antybiotyków [15, 16]. W pierwszej z tych prac na modelu *E. coli* Mg1655 wykazano, że ampicylina, norfloksacyna i kanamycyna w warunkach bez-tlenowego wzrostu tego szczepu, kiedy to rodniki tlenowe nie mogą być generowane w komórkach w reakcji Fentona, wykazują bardzo zbliżony

efekt bakteriobójczy jak w warunkach tlenowych. Ponadto w badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem mutantów pozbawionych aktywności katalazy i peroksydazy, zmiataczy H_2O_2 , nie ujawniono istotnych różnic w bakteriobójczym działaniu tych antybiotyków w porównaniu ze szczepem dzikiego; nie potwierdzono także zwiększonej produkcji H_2O_2 w ich obecności [15]. Podobne rezultaty opisano dla *E. coli* BW25113 w drugiej z cytowanych wcześniej prac, dowodząc, że w przeciwieństwie do wyników opisanych przez Foti i wsp. [10] bójczy efekt ofloksacyny w warunkach beztlenowych, kiedy nie powstają RTF, był znacznie silniejszy niż w tlenowych. Przytaczają również dane wskazujące, że mutant *Streptomyces pneumoniae*, niezdolny do produkcji rodników tlenowych, jest bardzo wrażliwy na działanie bakteriobójczych antybiotyków. Nie odnotowano również żadnego klinicznego szczepu tego gatunku opornego na antybiotyki, który byłby mutantem pozbawionym zdolności produkcji RTF [16]. Zachodzi pytanie o przyczyny tak poważnych różnic w wynikach badań przeprowadzonych przez uznane, specjalistyczne laboratoria naukowe. Można wymienić wiele przyczyn, które mogły doprowadzić do tak rozbieżnych wyników uzyskanych, zdawałoby się, w podobnych warunkach eksperymentalnych. Do takich przyczyn należy zaliczyć różnice w tle genetycznym użytych w badaniach modelowych szczepów, które w większości wywodzą się z historycznego szczepu *E. coli* K12 i jego pochodnych np. *E. coli* 1655. Znane są przypadki, że mało znacząca, jak by się wydawało, dotychczas nieznaną mutacją w jednym z modelowych szczepów (*E. coli* 1655) okazała się decydująca dla jego niezwykle wysokiej zdolności przyjmowania obcego DNA na drodze transformacji [27]. Ponadto ustalenie ściśle określonego jednego stężenia MIC antybiotyków różnych szczepów dzikich i ich mutantów, stosowanych w cytowanych badaniach, jest problematyczne, a nawet niemożliwe. Pomiar stopnia przeżywalności komórek, jako skutek działania lub braku działania reaktywnych form tlenu, wydaje się w tych warunkach mało precyzyjnym miernikiem dla formułowania uprawnionych wniosków. Nie można wykluczyć też obecności w puli modelowych szczepów małej populacji uśpionych metabolicznie komórek zwanych w literaturze angielskiej *persister cells*, które są odporne na działanie antybiotyków, mimo że komórki te nie noszą genów lekooporności. Wreszcie nie można zapominać, że preparaty antybiotyków, obok swoistego działania na określone tarcze komórkowe, wykazują nieswoistą aktywność na komór-

ki bakterii i w ten sposób mogą zmieniać ich fenotyp [28, 29]. Ponadto wciąż nie ma pełnej wiedzy ani na temat mechanizmów indukcji przez antybiotyki β -laktamowe autolizy komórek, ani na temat nieprawidłowej translacji (*mistranslation*), powodowanej przez antybiotyki aminoglikozydowe, prowadzącej do akumulacji toksycznych produktów białkowych i śmierci komórek [30]. Niezwykle ciekawe wyniki dotyczące molekularnego mechanizmu przeżywania komórek bakterii w obecności wysokich stężeń antybiotyków opisano dla oportunistycznych bakterii *Burkholderia cepacia complex* (*Bcc*), odpowiedzialnych za groźne dla życia infekcje pacjentów z niedoborami układu odpornościowego, w tym cierpiących na mukowiscydozę [31, 32, 33]. Eradykacja patogennych bakterii jest niezwykle trudna z racji wysokiej oporności bakterii na większość stosowanych antybiotyków, zwłaszcza rosnących w postaci biofilmu. Na zjawisko bardzo wysokiej oporności bakterii nakładają się różne molekularne mechanizmy [4], w tym mało poznany mechanizm uśpiania metabolicznego (*persister cells*) małej frakcji komórek w obecności wysokich stężeń antybiotyków. W wypadku *Bcc* wykazano, że w biofilmie traktowanym tobramycyną w stężeniu 1024 $\mu\text{g/ml}$ przeżywa około 0,1% populacji komórek, a równoczesne pomiary stężenia RFT ujawniły bardzo istotny wzrost ich syntezy. Postawiono więc pytanie, jakie mechanizmy, czynniki chronią komórki uśpione metabolicznie przed bójczym działaniem nie tylko antybiotyków, lecz także RFT. Analiza transkryptomu tych opornych na antybiotyki komórek przyniosła nowe, ważne dane wskazujące, że w komórkach nastąpiło bardzo silne zahamowanie ekspresji genów cyklu Krebsa i łańcucha transportu elektronów generujących RTF, z równoczesną indukcją genów szlaku glioksalowego (*glyoxylate shunt*). Potwierdzeniem tej obserwacji były rezultaty uzyskane dla mutantów ΔkatA i ΔkatB pozbawionych aktywności, odpowiednio katalazy i peroksydazy. Okazało się, że traktowanie tych komórek turbomycyną generuje znacznie mniejszą populację komórek uśpionych metabolicznie, opornych na antybiotyki. Ponadto zablokowanie za pomocą inhibitora kwasu itakonowego w dzikim szczepie *Bcc* liazy izocytrynianowej (ICL), pierwszego enzymu szlaku glioksalowego, 10-krotnie zmniejszyła liczbę pojawiających się w biofilmie komórek uśpionych metabolicznie i opornych na wysokie stężenia turbomycyny. Przedstawione wyniki wskazują, że komórki uśpione metabolicznie wyciszają tlenowy szlak transportu elektronów, by zahamować syntezę RTF, a równocześnie aktywują szlak glioksalowy. Reasu-

mując, mechanizmy aktywowania tlenowych szlaków generujących syntezę reaktywnych form tlenu, a także hamowania szlaku glioksalowego mogą być rozważane jako propozycje dla opracowania nowych, bardzo skutecznych strategii terapeutycznych dla leczenia zakażeń *Bcc*, tym bardziej że ludzkie komórki nie mają genów i enzymów szlaku glioksalowego [33]. Ponadto autorzy cytowanych prac piszą, że uzyskane wyniki w badaniach biofilmu *Bcc* traktowanego tobramycyną, cyprofloksacyną i meropenemem, z równoczesnymi pomiarami ilości syntetyzowanych RTF oraz przeżywalności komórek, z zastosowaniem różnych komplementarnych metod i technik, pozwalają na postawienie uprawnionego wniosku o znaczącym udziale RTF w uwrażliwianiu komórek *Bcc* na zastosowane antybiotyki. Wspomniane wcześniej kontrowersje wokół udziału reaktywnych form tlenu indukowanych działaniem antybiotyków w bakterio-bójczym działaniu mogą wynikać z zastosowania w różnych laboratoriach odmiennych modeli badawczych, to jest różnych gatunków i szczepów bakterii oraz różnych antybiotyków. Może to być związane również z odmiennymi warunkami przeprowadzonych doświadczeń, a także odmiennymi, nie zawsze wystarczająco czułymi metodami stosowanymi do pomiaru ilości produkowanych RTF oraz oceny stopnia przeżywalności komórek. Dobrym przykładem potwierdzającym powyższe sformułowanie są wyniki niedawno opublikowanej pracy, uzyskane na modelu dzikiego szczepu *Salmonella Typhimurium* oraz mutantu pozbawionego katalazy, badanych w różnych warunkach oraz fazach wzrostu i traktowanych różnymi antybiotykami [34]. Wyniki tej bardzo dobrze udokumentowanej pracy wskazują, że różne warunki hodowli, rodzaj podłoża, temperatura, pH, a nawet faza wzrostu bakterii mają bardzo istotny wpływ na produkcję RTF, a tym samym na przeżywalność bakterii poddanych ekspozycji na antybiotyki takie jak: gentamycyna, streptomycyna, kanamycyna, cyprofloksacyna, cetotaxymina, ampicylina).

W naszej opinii komentowane kontrowersje w większości zostały wyjaśnione wynikami wieloautorskiej pracy doświadczalnej zatytułowanej „Antibiotics induce redox-related physiological alterations as a part of their lethality”, opublikowanej w maju 2014 r. przez wybitnych uczonych z Howard Hughes Medical University, Boston University, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Columbia University, Harvard University [18]. W realizację celów tej pracy wprężnięto najnowszą specjalistyczną aparaturę, wiele najnowszych, alternatywnych technik i metod

biochemicznych do precyzyjnego pomiaru stężenia RTF, metod genetycznych dla konstrukcji ściśle zdefiniowanych mutantów w celu ustalenia roli określonych genów i operonów, indukowanych działaniem różnych klas antybiotyków. Badania zostały przeprowadzone na modelu komórek *Escherichia coli* zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, w tym w obecności różnych zmiataczy rodników tlenowych, a walidację uzyskanych wyników przeprowadzono dobranymi metodami statystycznymi. Opisane w tej pracy wyniki są znakomicie udokumentowane i w pełni wiarygodne.

Do jednego z najważniejszych rezultatów opisanych w tej pracy należy zaliczyć, po pierwsze, jednoznaczne potwierdzenie, że komórki bakterii w odpowiedzi na działanie badanych antybiotyków należących do różnych klas – β -laktamowych (ampicylina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aminoglikozydowych (gentamycyna 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fluorochinolonów (norfloksacyna, 250 ng/ml) – syntetyzują bardzo znaczące ilości RTF. Co więcej, okazało się, że indukcja syntezy RTF jest związana ze specyficznym działaniem danego antybiotyku na określoną tarczę molekularną w komórce bakteryjnej, a więc z wprowadzonymi do komórki pierwotnymi uszkodzeniami. Dla przykładu norfloksacyna nie indukuje syntezy RTF w szczepie noszącym zmutowany gen gyrazy (*gyrA17*), a stąd opornym na działanie fluorochinolonów. Można sądzić z dużą dozą prawdopodobieństwa, że podobne wyniki są możliwe w wypadku wielu innych szczepów i gatunków bakterii opornych na różne antybiotyki, z racji noszonych przez te szczepy genetycznych determinant oporności na antybiotyki, wydajnych systemów *efflux pumps*, lub zjawiska *persister cells*, opisywanych w jednym z naszych wcześniejszych artykułów [4]. Drugim ważnym wynikiem tej pracy jest udowodnienie za pomocą skonstruowanych bardzo czułych testów biochemicznych, że badane antybiotyki indukują syntezę H_2O_2 , co było wcześniej podważane w doświadczeniach z wykorzystaniem mutantów pozbawionych aktywności katalazy i peroksydazy, w których spodziewano się podwyższenia puli H_2O_2 . Okazało się, że inny enzym – cytochromowa oksydaza bd – kompensuje brak katalazy i peroksydazy w „zmiataniu” H_2O_2 . Ponadto generowany H_2O_2 jest wykorzystywany w reakcji Fentona jako substrat do syntezy rodników hydroksylowych, a stąd było trudno precyzyjnie mierzyć rzeczywisty poziom syntetyzowanego w komórkach H_2O_2 . Do bardzo ważnych wyników tej pracy należy zaliczyć wykazanie, że badane antybiotyki bardzo silnie aktywują promotory operonów od-

powiedzi na stres oksydacyjny, OxyR i SoxRS, z których pierwszy, jak było wiadomo już wcześniej, jest indukowany H_2O_2 , drugi zaś anionorodnikiem ponadtlenkowym [35]. Uzyskano bardzo wysoki poziom aktywacji badanych promotorów reporterowych, a także całych operonów odpowiedzi na stres oksydacyjny w analizowanych transkryptomach komórek traktowanych zarówno ampicyliną, gentamycyną, jak i norfloksacyną w stężeniach odpowiednio 5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ i 250 $\mu\text{g/ml}$, jak i H_2O_2 w stężeniu 10 μM . Reasumując, wyniki badań biochemicznych, enzymatycznych, genetycznych, w tym z wykorzystaniem mikromacierzy dla analizy całego transkryptomu, upoważniają do sformułowania wniosku, że badane antybiotyki: ampicylina, gentamycyna i norfloksacyna indukują w komórkach *Escherichia coli* syntezę reaktywnych form tlenu oraz aktywują regulowaną odpowiedź na stres oksydacyjny w sposób bardzo podobny jak w wypadku traktowania komórek egzogennym H_2O_2 w stężeniu 10 μM . Postawiono hipotezę, że proces indukowania przez antybiotyki syntezy reaktywnych form tlenu w różnorodnych reakcjach redukcji i utleniania komórkowego winien mieć odzwierciedlenie w postaci istotnych zmian w konsumpcji tlenu przez populacje bakterii traktowanych antybiotykami (*bacterial oxygen consumption rate*, OCR). Autorzy opracowali metodę, system do monitorowania w czasie rzeczywistym zużycia tlenu w rosnących hodowlach bakterii w obecności i nieobecności antybiotyków. Okazało się, że badane antybiotyki znacząco zwiększają konsumpcję tlenu, co potwierdzało wcześniej opisany efekt działania tych antybiotyków w postaci bardzo silnego podwyższenia ładunku energetyczne komórek (*energy charge*), mierzonego stosunkiem ATP/ADP.

Kontrowersje, o których dyskutowano wcześniej, dotyczyły pytania, czy i w jakim stopniu RTF mają udział w bójkowym działaniu antybiotyków na bakterie. Wcześniejsze obserwacje sugerowały pośrednio, że deficyt w komórkach bakterii zmiataczy reaktywnych form tlenu, enzymów katalazy (KatG) i peroksydazy (AhpC), bardzo zwiększa śmiertelność komórek w obecności antybiotyków [13]. Jednakże wyniki innej pracy przeczyły tej hipotezie, bowiem nie obserwowano żadnej różnicy w śmiertelności komórek traktowanych antybiotykami, rosnących w warunkach tlenowych w porównaniu z warunkami beztlenowymi, kiedy reaktywne formy tlenu nie są syntetyzowane [15]. Wyniki komentowanej pracy Dwyera i wsp. dowodzą bezpośrednio, że w ochronie komórek bakterii przed śmiercią w obecności badanych antybiotyków udział mają

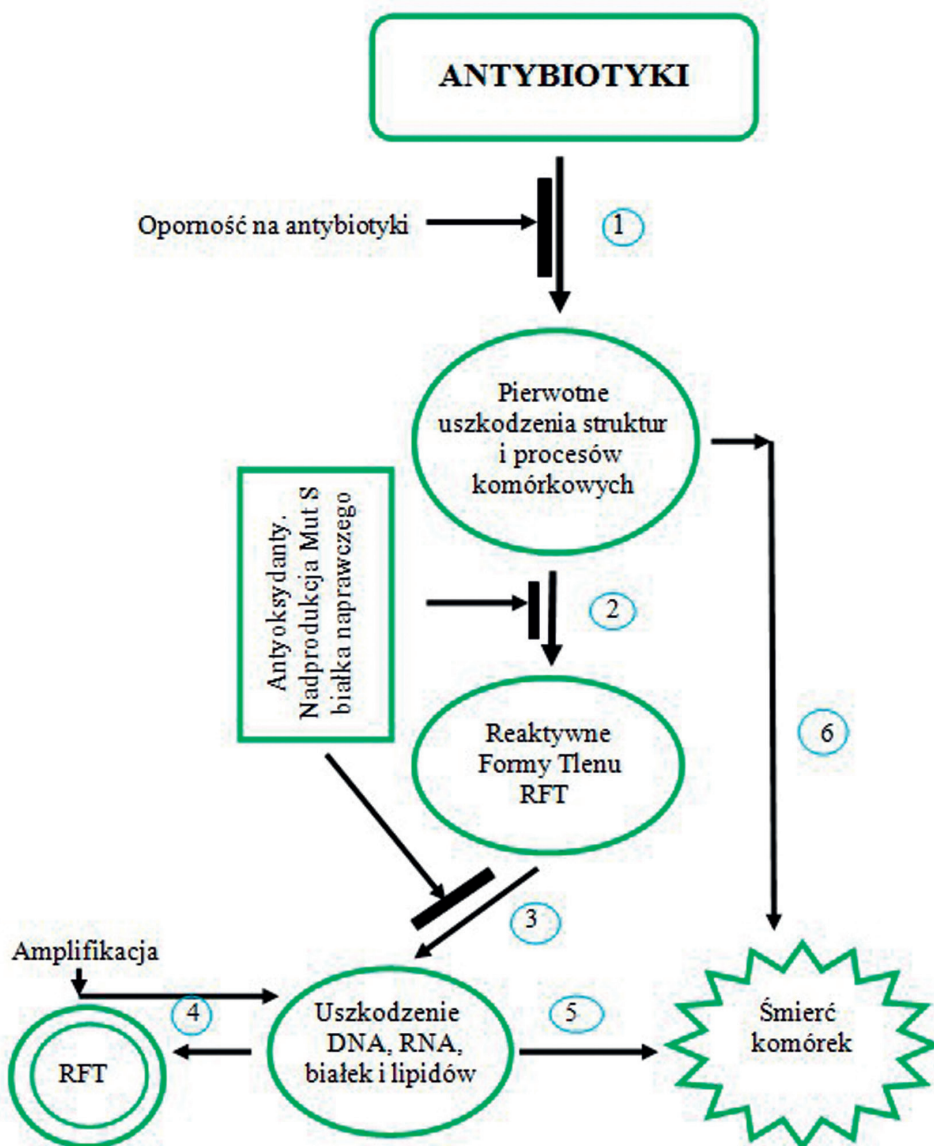
nie tylko katalaza i peroksydaza, zmiatacze reaktywnych form tlenu, lecz także regulowane odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny, indukowane przez antybiotyki. Nawet w komórkach mutanta *E. coli* HpX, z niedoborem aktywności katalazy i peroksydazy, indukcja operonu odpowiedzi na stres oksydacyjny egzogennym H_2O_2 – w znacznym stopniu chroni komórki przed śmiercią w obecności antybiotyków. Wiadomo było już wcześniej, że nadprodukcja białka MutS, odpowiedzialnego za rozpoznanie błędnie sparowanych zasad w DNA w wyniku inkorporacji przez polimerazę IV uszkodzonych nukleotydów, generowanym przez antybiotyki rodnikiem hydroksylowym, redukuje częstość mutagenyzy [36]. W komentowanej pracy Dwyera i wsp. (2014 r.) dowiedziono także, że przeżywalność komórek traktowanych badanymi antybiotykami, w warunkach nadprodukcji tego ważnego białka sytemu MRS (*mismatch repair system*), zwiększa się populacja *Escherichia coli* o 4–5 rzędów. Potwierdzono także, że antyoksydanty, glutation, kwas askorbinowy, zmiatacze rodników tlenowych, stosowane w stężeniach niehamujących wzrostu bakterii, zwiększają przeżycie bakterii w obecności badanych antybiotyków co najmniej o 1 rząd. Trzeba jednak w tym miejscu dodać, że nadprodukcja katalazy, peroksydazy czy obecność antyoksydantów w różnym stopniu chroni komórki bakterii przed śmiercią, w zależności od rodzaju stosowanych antybiotyków i mechanizmu ich pierwotnego, specyficznego działania na struktury i procesy komórkowe. W większości badanych przypadków najsilniejszą protekcję przed bójącym działaniem RTF obserwowano w przypadku ampicyliny, najmniejszą w przypadku norfloksacyny. Autorzy ten efekt tłumaczą działaniem norfloksacyny na DNA, antybiotyku, który uszkadza nukleotydy i z dużą częstością wprowadza letalne, podwójne pęknięcia do helisy DNA [10, 37]. Ampicylina, przedstawiciel antybiotyków β -laktamowych, działa przede wszystkim na syntezę ściany komórkowej, a zatem w mniejszym stopniu wprowadza do DNA groźne dla życia komórki letalne uszkodzenia.

W świetle najnowszych danych literatury światowej, przedstawionych w niniejszym artykule, coraz lepsze, głębsze zrozumienie przyczyn i mechanizmów śmierci komórek w wyniku działania różnych klas antybiotyków, w tym generujących reaktywne formy tlenu w różnych warunkach wzrostu bakterii, zwłaszcza rosnących w postaci biofilmu, stanowi w opinii specjalistów pewien drogowskaz dla opracowania stosownych zaleceń praktycznych dla poprawienia skuteczności powszechnie stoso-

wanych antybiotyków. Jednym z nich jest unikanie w czasie antybiotykoterpii składników diety i suplementów zawierających antyoksydanty lub związki aktywujące syntezę lub aktywność katalazy, peroksydazy czy oksydazy cytochromowej. Być może możliwe stanie się także opracowanie nowych strategii terapii bakteryjnych chorób infekcyjnych, z wykorzystaniem specyficznych adjuwantów wzmagających, poprzez większy udział komponentów RTF w bójczym, antibakteryjnym działaniu powszechnie stosowanych antybiotyków.

Podsumowanie

Jako podsumowanie niniejszego artykułu przedstawiamy schemat (rys. 1) obrazujący złożoną odpowiedź komórek bakterii na stresogenne działanie różnych klas antybiotyków, indukcję syntezy reaktywnych form tlenu oraz ich wpływ na przeżywalność komórek. Opracowany przez nas schemat jest zgodny z danymi literatury światowej, prezentowanymi w niniejszym artykule, w tym w cytowanych przez nas pracach opublikowanych w ostatnich 2–3 latach. [18,38].



Rys. 1. Główne etapy letalnego działania antybiotyków

Etap 1. *Działanie antybiotyków na komórki bakterii prowadzi do pierwotnych uszkodzeń struktur i procesów komórkowych, które są charakterystyczne dla danej klasy antybiotyków i zależne od ich specyficznego działania na określone tarcze molekularne.*

W laboratoriach mikrobiologicznych skuteczność antybiotyków ocenia się zwykle poprzez oznaczenie wartości MIC lub zliczanie liczby kolonii wyrosłych na podłożach stałych w obecności określonych stężeń antybiotyków. Parametry te nie odzwierciedlają jednak samego efektu bójczego antybiotyków, to jest wydajności w zabijaniu komórek, bowiem są zależne od wielu innych czynników takich jak: szybkość transportu antybiotyków do wnętrza komórki, sprawność białek transportowych i mechanizmu *efflux pumps*, stopień powinowactwa danego antybiotyku i docelowej tarczy komórkowej, oporność genetyczna lub fizjologiczna na określone antybiotyki [4, 5].

Etap 2. *Pierwotne uszkodzenia struktur i procesów komórkowych stymulują szlaki metaboliczne do syntezy reaktywnych form tlenu.*

Szlaki te można blokować, a zatem ograniczać w komórkach pulę RTF, poprzez traktowanie komórek chelatorami jonów żelaza lub antyoksydantami, hamowanie transportu łańcucha elektronów oraz enzymów cyklu Krebsa. Szlaki te można także stymulować, a zatem zwiększać komórkową pulę ROS, poprzez inaktywację genów kodujących syntezę katalazy i peroksydazy lub hamowanie ich aktywności.

Etap 3. *Rodniki tlenowe, w tym szczególnie rodnik hydroksylowy, generowany w reakcji Fentona, wprowadzają drugorzędowe uszkodzenia w cząsteczkach DNA, RNA, białek i lipidów.*

Etap 4. *Drugorzędowe uszkodzenia polimerów komórkowych dodatkowo bardzo silnie stymulują syntezę reaktywnych form tlenu, a kiedy ich pula komórkowa osiągnie poziom krytyczny, rozpoczyna się proces jej gwałtownej amplifikacji.*

Etap 5. *Amplifikacja puli RTF prowadzi nieuchronnie do śmierci komórek.*

Etap 6. *Pierwotne, bardzo rozległe i głębokie uszkodzenia (severe enough) mogą być bezpośrednią przyczyną śmierci komórek, bez konieczności stymulacji i amplifikacji RFT.*

Poziom zabijanych komórek w populacji w wyniku głębokich pierwotnych uszkodzeń struktur i procesów komórkowych w wyniku działania antybiotyków w wysokich stężeniach, powyżej MIC, może być oceniany w doświadczeniach z zastosowaniem związków blokujących syntezę rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona lub znoszących aktywność RTF poprzez działanie „zmiataczy”: katalazy, peroksydazy, oksydazy cytochromowej bd lub antyoksydantów.

Piśmiennictwo

1. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74(3): 417- 433.
2. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9): 1279-1286.
3. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(3):175-186.
4. Jaworski A, Jurczak I, Adamczyk J. Molekularne mechanizmy i procesy komórkowe odpowiedzialne za pojawianie się oraz rozsiewanie w środowiskach naturalnych szczepów bakterii opornych na antybiotyki. *JHSM* 2016; 3: 29-50.
5. Jaworski A, Jurczak I. Geny oporności na antybiotyki są częścią metagenomu hodowlanych i niehodowlanych bakterii środowiskowych. *JHSM* 2016; 2: 5-22.
6. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406(6797): 775-781.
7. Albasa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(2): 605-609.

8. Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(3): 949-954.
9. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 2007;3:91.
10. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Science. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. 2012; 336(6079): 315-319.
11. Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbiol* 2014; 21: 1-6.
12. Imlay JA, Fridovich I. Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radic Res Commun* 1991;12-13: 59-66.
13. Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4): 1395-1402.
14. Wiegand I, Marr AK, Breidenstein EB, Schurek KN, Taylor P, Hancock RE. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10): 3810-3813.
15. Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 2013; 339(6124): 1210-1213.
16. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 2013; 339(6124): 1213-1216.
17. Imlay JA. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol* 2015; 24: 124-131.

18. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(20): E2100-9.
19. Tassotto ML, Mathews CK. Assessing the metabolic function of the MutT 8-oxodeoxyguanosine triphosphatase in *Escherichia coli* by nucleotide pool analysis. *J Biol Chem* 2002; 277(18): 15807-15812.
20. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(15): 7022-7025.
21. Saraswat V, Massiah MA, Lopez G, Amzel LM, Mildvan AS. Interactions of the products, 8-oxo-dGMP, dGMP, and pyrophosphate with the MutT nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* 2002; 41(52): 15566-15577.
22. Rotman E, Kuzminov A. The mutT defect does not elevate chromosomal fragmentation in *Escherichia coli* because of the surprisingly low levels of MutM/MutY-recognized DNA modifications. *J Bacteriol* 2007; 189(19): 6976-6988.
23. Kottur J, Nair DT. Reactive Oxygen Species Play an Important Role in the Bactericidal Activity of Quinolone Antibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016; 55(7): 2397-23400.
24. Ito R, Hayakawa H, Sekiguchi M, Ishibashi T. Multiple enzyme activities of *Escherichia coli* MutT protein for sanitization of DNA and RNA precursor pools. *Biochemistry* 2005; 44(17): 6670-6674.
25. Taddei F, Hayakawa H, Bouton M, et al. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science* 1997; 278(5335): 128-130.
26. Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nyström T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 7(11): 5746-5749.

27. Maciąg-Dorszyńska M, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G. Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication in vivo and in vitro. *FEBS Open Bio* 2013; 3: 161-164.
28. Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbiol* 2014; 21: 1-6.
29. Zhao X, Hong Y, Drlica K. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(3): 639-642.
30. Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. Mis-translation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 2008; 135(4): 679-690
31. Lipuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11(6): 528-533.
32. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(2): 144-156.
33. Van Acker H, Gielis J, Acke M, Cools F, Cos P, Coenye T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria. *PLoS One* 2016 ; 11(7): e0159837.
34. van der Heijden J, Vogt SL, Reynolds LA, et al. Analysis of bacterial survival after exposure to reactive oxygen species or antibiotics. *Data Brief* 2016; 7: 894-899.
35. Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2012; 525(2): 161-169.
36. Gutierrez A, Laureti L, Crussard S, et al. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat Commun* 2013; 4: 1610.

37. Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, Callura JM, Collins JJ. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Mol Cell* 2012; 46(5): 561-572.

38. Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbio* 2014; 21: 1-6.

Adres do korespondencji

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Instytut Nauk o Zdrowiu, Społeczna Akademia Nauk,

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl