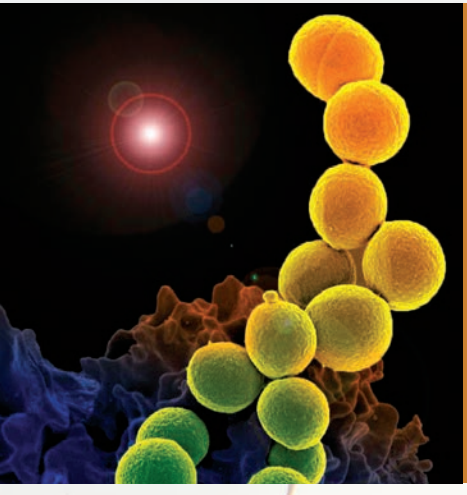
Akademie věd České republiky

Strategie AV21

Špičkový výzkum ve veřejném zájmu



Jaroslav Spížek

Boj s rezistencí na antibiotika

VÝZKUMNÝ PROGRAM

POTRAVINY PRO BUDOUCNOST

Obsah

Souhrn _____ **2**

Úvod _____ **2**

Antibiotika – definice _____ **5**

Přirozená a modifikovaná antibiotika _____ **5**

Příprava nových vakcín proti rezistentním bakteriálním kmenům _____ **9**

Hledání nových antibiotik _____ **10**

Nově schválená antibiotika a antibiotika ve vývoji _____ **11**

Hledání nových antibiotik v netradičních nebo méně tradičních zdrojích _____ **13**

Genové sekvence mikroorganizmů – hledání genů specifikujících biosyntézu antibiotik _____ **15**

Zapomenutá antibiotika, která by mohla a měla být revitalizována _____ **18**

Nová zásahová místa pro antibiotika _____ **21**

Diskuse a závěry _____ **23**

Slovníček pojmů _____ **26**

Literatura _____ **27**

Souhrn

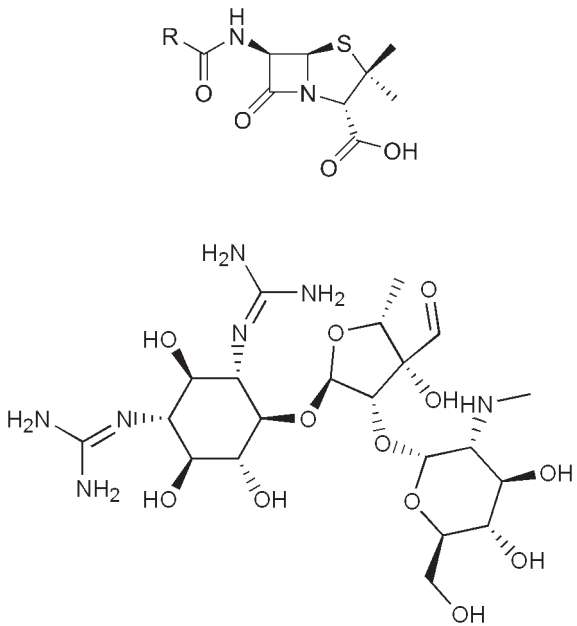
Rezistence na antibiotika a další antimikrobiální sloučeniny trvale narůstá a zdá se, že boj proti ní je válka, která se nedá nikdy vyhrát. Síla obrovského množství mikroorganizmů se zdá překonávat naše léčiva. Přesto však existují určité naděje a možnosti, jak tuto situaci alespoň částečně zlepšit. V tomto přehledu se pokusíme diskutovat některé kroky, které je možno využít v boji proti rezistenci, jako jsou (1) příprava nových vakcín proti rezistentním bakteriálním kmenům; (2) hledání nových antibiotik v tradičních i netradičních zdrojích přírodních látek; (3) hledání genů specifikujících biosyntézu antibiotik; (4) využití zapomenutých přírodních sloučenin a jejich transformace a (5) hledání nových zásahových míst pro antibiotika. Zvláštní pozornost chceme věnovat hledání nových sloučenin, které by mohly inhibovat patogenní bakterie rezistentní vůči současným antibiotikům.

Úvod

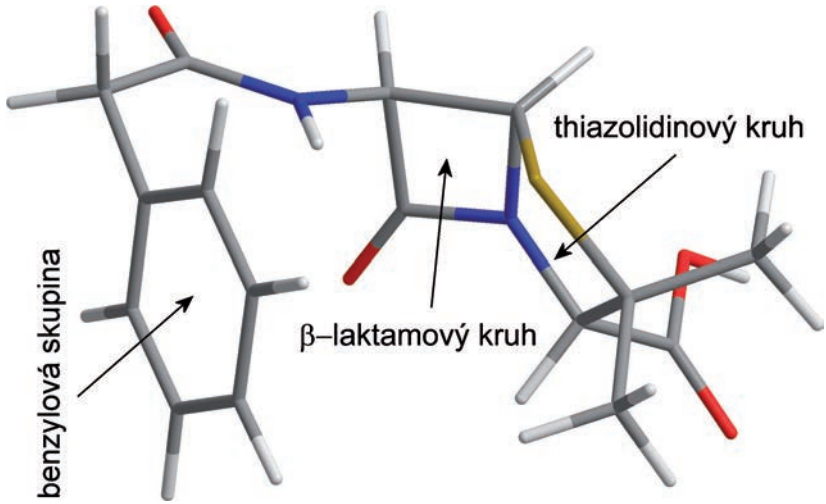
Klinická účinnost penicilinu a streptomycinu (**obr. 1, 1a, 1b**) vzbudila pozornost veřejnosti, neboť se ukázalo, že tyto sloučeniny opravdu zachraňují lidské životy. Termín antibiotikum se stal přirozenou součástí vědecké terminologie i běžného slovníku veřejnosti. Slovo „antibiotikum" bylo v angličtině původně použito jako přídavné jméno. V r. 1947 Selman A. Waksman publikoval definici podstatného jména antibiotikum, která zněla: „Antibiotikum je chemická látka, která má schopnost inhibovat růst bakterií a dalších mikroorganizmů, nebo je i ničit." Mimochodem Waksman, objevitel streptomycinu, už jako nositel Nobelovy ceny za medicínu navštívil v r. 1963 Mikrobiologický ústav AV ČR ještě v jeho tehdejším sídle na Flemingově náměstí v Praze 6. Autor tohoto článku měl tu čest se s ním tehdy poprvé, ale nikoli naposled setkat. Waksman zdůrazňoval, že antibiotika nejsou pouze antimikrobiální sloučeniny, ale že jsou také produkty mikrobního metabolizmu. Nejznámější Waksmanova definice zní, že antibiotika jsou „mikroorganizmy produkované chemické látky, které mají schopnost v nízkých koncentracích inhibovat růst jiných mikroorganizmů, nebo je i zabíjet". Stojí za povšimnutí, že původně vlastně vylučoval sloučeniny produkované rostlinami, živočichy nebo vyráběné chemickou syntézou. Současná terminologie tento rozdíl neuznává. Protože většina prvních antibiotik byla účinná pouze proti bakteriím a protože zdravotníci varovali své pacienty, že se antibiotika nemají používat proti virovým infekcím, užívá se nyní termín „antibiotikum" zjednodušeně jako synonymum pro „antibakteriální" vlastně jen proto, aby se usnadnila komunikace mezi lékařem a pacientem. Waksman ovšem nikdy nezmínil, že jednou z nejdůležitějších vlastností antibiotik je to, že dobré antibiotikum nepoškozuje pacienta, ale přitom

ovlivňuje střevní mikroflóru. Mnoho dosavadních definic pokračuje ve Waksmanově tradici a soustřeďuje se na antimikrobiální aktivitu sloučenin, a nikoli na jejich selektivní účinky. Podle Joan Bennettové (Bennett 2015) je důležité porozumět tomu, jak se slovo „antibiotikum" používá v různých souvislostech tak, aby současní vědci v tomto oboru mohli těžit z rozsáhlé vědecké a patentové literatury.

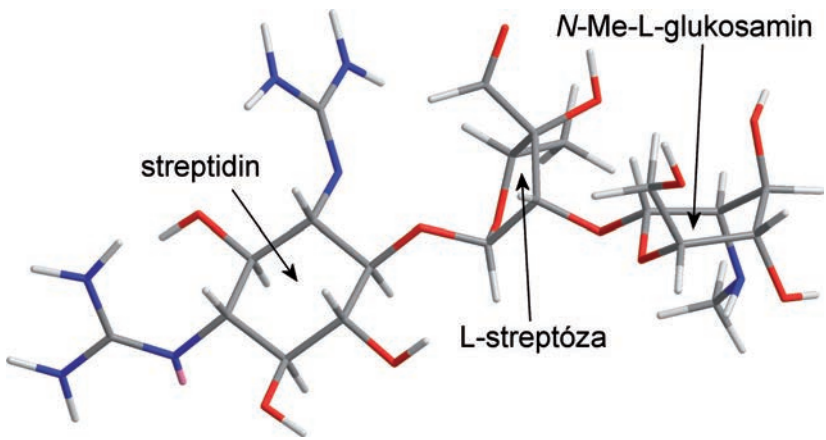
V této práci se budeme opírat o mírně modifikovanou definici Waksmanovu. Původně se za antibiotika považovaly nízkomolekulární látky s hmotností nižší než 2000 Da. Později se však mezi antibiotika zařadily i látky s hmotností vyšší a dnes se mezi ně řadí i peptidické látky (např. neokarcinostatin, nisin, tendamistat), které mají hmotnost podstatně vyšší než podle původní definice. Za antibiotika jsou dnes pokládány i bakteriociny produkované různými bakteriemi, jako jsou kolicin z *Escherichia coli*, megacin z *Bacillus megaterium* a pyocin z *Pseudomonas aeruginosa*, což jsou bílkoviny, které se vážou na specifické receptory v bakteriálních buňkách a mají antibiotickou aktivitu proti jiným kmenům stejných mikroorganizmů.



Obr. 1a, b. Vzorce penicilinu (výše) a streptomycinu (níže)



Obr. 1c. **Benzylpenicilin, prostorové uspořádání**



Obr. 1d. **Streptomycin, prostorové uspořádání**

Antibiotika – definice

- Nízkomolekulární metabolity produkované mikroorganizmy, které inhibují růst nebo zabíjejí jiné mikroorganizmy (hmotnost nižší než 2000 Da).
- Velmi různorodá skupina chemických látek s velmi různými biologickými účinky, které se používají v humánní a veterinární medicíně.
- Některá peptidická antibiotika (např. neokarcinostatin, nisin, tendamistat) mají hmotnost mnohem vyšší než podle původní definice.
- Bakteriociny produkované bakteriemi (kolicin z *Escherichia coli*, megacin z *Bacillus megaterium*, pyocin z *Pseudomonas aeruginosa*) jsou bílkoviny, které se vážou na specifické receptory a mají biologickou aktivitu proti jiným kmenům stejných mikroorganizmů.

Přirozená a modifikovaná antibiotika

- Antibiotika vyráběná fermentační cestou se kromě použití proti patogenním mikroorganizmům používají také v terapii nádorových onemocnění apod. V této publikaci se zabýváme pouze antimikrobiálními antibiotiky.
- Přirozená antibiotika se často chemicky modifikují nebo jsou pomocí biotransformace přeměňována na nové látky s novými biologickými účinky.

Infekční nemoci jsou celosvětově zodpovědné za zhruba jednu čtvrtinu všech úmrtí. Od zavedení penicilinu ve čtyřicátých letech minulého století se antibiotika jevila jako nejdůležitější nástroj v boji proti infekčním nemocem a umožnila mnoho postupů moderní medicíny, jako jsou chemoterapie nádorových onemocnění, transplantace orgánů, péče o nedonošené děti a další. Přes význačný pokrok v těchto oblastech jsme svědky podstatného navýšení počtu patogenních mikroorganizmů rezistentních na antimikrobiální (antibakteriální, antivirální, antiparazitární a antifungální) sloučeniny. Podle nedávné zprávy hlavního lékaře (chief medical officer) Velké Británie je rezistence vůči antimikrobiálním látkám již katastrofální a pokračující nárůst počtu organizmů rezistentních na jednu nebo více antimikrobiálních sloučenin je jednou z největších hrozeb, s kterými se nyní střetáváme. Některé formy rezistence se mohou přenášet mezi různými druhy bakterií a parazitů, což může vést ke vzniku organizmů rezistentních vůči mnoha, většině nebo všem nyní dostupným léčivům.

Poslední stanovisko ministrů pro vědu skupiny G8 se soustředilo na globální výzvu antimikrobiální rezistence a Světová zdravotnická organizace vyjádřila obavy, že tento trvale narůstající problém může zabránit dosažení cílů tisíciletí pro rok 2015. Na jednání těchto institucí uzavřeli, že globální pandemie rezistence vůči antibiotikům v lidské komunitě a zejména v nemocnicích představuje hlavní zdravotní

a ekonomickou zátěž, že tato krize ještě dále narůstá kvůli relativnímu nedostatku inovací při vývoji nových antibiotik a že jsme tak vystaveni nebezpečí návratu do preantibiotického období.

V článku skupiny významných vědců autoři rozdělili témata, která bychom měli studovat, na základní výzkum rezistence, aktivity, jako jsou vzdělávání veřejnosti, veřejné zdraví, sanitární otázky a kvalita života, nová antibiotika, „stará" antibiotika, kontrola používání antibiotik, alternativy k antibiotikům a mezinárodní spolupráci v této oblasti. Je zřejmé, že infekční onemocnění patří k důležitým příčinám úmrtí lidí a zřejmě k nejvýznamnějším příčinám úmrtí dětí a starých lidí. Bakterie, které působí závažné zdravotní problémy, zahrnují zejména tzv. ESCAPE („unikající") patogeny *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* nebo *Klebsiella pneumoniae* (u různých autorů není absolutní soulad v tom, zda sem patří hlavně

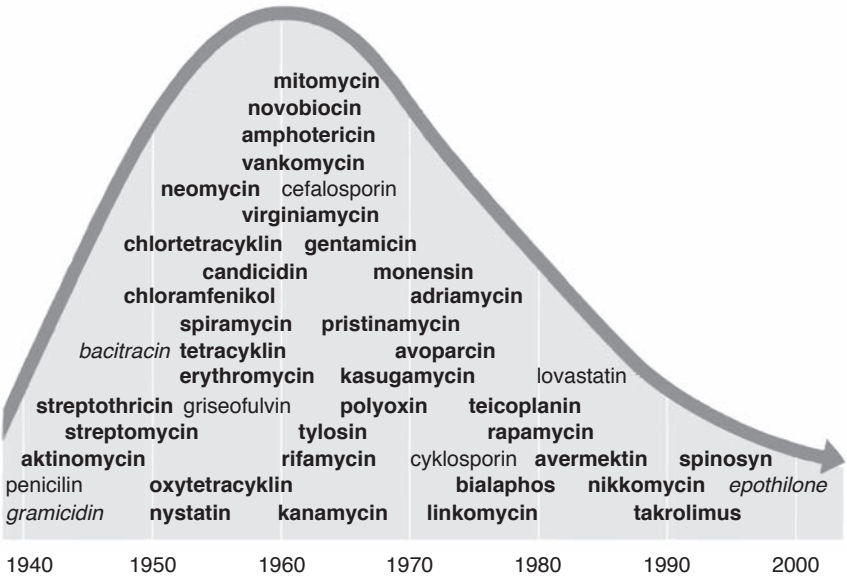
Tabulka 1. Mikroorganizmy, které působí závažné zdravotní problémy

Bakterie	
Enterococcus faecium	*Escherichia coli* O157-H7
Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*
Acinetobacter baumannii	*Legionella pneumophila*
Streptococcus pneumoniae	*Borrelia burgdorferi*
Mycobacterium tuberculosis	*Helicobacter pylori*
streptokoky skupiny A	*Vibrio cholerae*
Escherichia coli	*Haemophilus influenzae*
Burkholderia cepacia	

Viry	**Eukaryotické mikroorganizmy**
HIV	*Plasmodium falciparum*
hantavirus	*Candida albicans*
ebola	*Aspergillus niger*
virus slintavky	*Pneumocystis carinii*
SARS	*Cryptococcus*
virus ptačí chřipky	*Trichomonas*
Priony	*Crystosporidium*
BSE	

Clostridium difficile nebo *Klebsiella pneumoniae*, pozn. autora), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a další druhy rodu *Enterobacter*. Methicilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* jsou zvláště nebezpečné. Na seznam bakterií, které působí závažné zdravotní komplikace, patří také *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, streptokoky skupiny A, *Salmonella pneumoniae*, *Escherichia coli* 0157-H7, *Legionella pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori* a další.

Dlouho se zdálo, že antibiotika jsou všemocná a že jejich použití proti patogenním bakteriím vymýtí infekční nemoci. Toto období se nazývalo „golden age" tedy zlatý věk antibiotik. Během tohoto období byla izolována většina běžně používaných antibiotik a vypadalo to, že válka proti infekčním mikroorganizmům skončila. William H. Stewart, hlavní chirurg USA (USA Surgeon-General), v r. 1967 konstatoval, že „je možné uzavřít knihu o infekčních nemocech, prohlásit válku proti infekcím za vyhranou a přesunout zdroje na chronická onemocnění, jako jsou rakovina a kardiovaskulární



Obr. 2. Zlatý věk antibiotik. Na grafu je znázorněn časový průběh objevů antibiotik v letech 1940–2000. Tučně jsou vyznačena antibiotika produkovaná aktinomycetami, normálně antibiotika produkovaná houbami a kurzivou antibiotika produkovaná bacily (podle Hopwooda: Streptomyces in Nature and Medicine. *The Antibiotic Makers* 2007)

onemocnění". To bylo velmi optimistické. Avšak už tehdy řada vědců upozorňovala, že mikroorganizmy jsou velmi variabilní, velmi rychle rostou (reprodukují se každých 30 min.) a během této reprodukce se selektují mutanti rezistentní proti nepříznivým podmínkám, které je ohrožují. Zlaté období let 1940–2000, kdy byla objevena většina antibiotik (**obr. 2**), bylo již u konce, když sám William H. Stewart musel přiznat, že „jeho názor byl naprosto mylný" (observation had been dead wrong).

Bakterie rychle vyvinuly rezistenci, často hned potom, co bylo antibiotikum uvedeno do klinické praxe. Bakterie žijí na Zemi již několik miliard let. Během této doby se v přírodě setkaly s velmi širokým spektrem přirozeně se vyskytujících antibiotik. Aby mohly přežít, vyvinuly rezistenční mechanizmy. Není proto překvapivé, že se

Tabulka 2. Hlavní producenti antibiotik

Produkční organizmus		Počet produkovaných antibiotik	
Aktinobakterie	*Streptomyces sp.*	11 000	14 500
	další aktinobakterie	3400	
Eubakterie	myxobakterie	450	
	cyanobakterie	400	
	další bakterie	800	
Houby	mikroskopické houby (*Aspergillus*, *Penicillium*)	9000	
	basidiomycety	2900	
	jiné houby včetně kvasinek, slizovek atd.	110	
Mikroorganizmy celkově			42 560
Vyšší organizmy	vyšší rostliny	15 000–16 000	23 500–28 000
	nižší rostliny včetně řas a mechů	1500–2000	
	produkty suchozemských živočichů	1000–2000	
	mořské produkty (rostliny a živočichové)	6000–8000	
Celkový odhadovaný počet přirozených antibiotik			66 060–70 560

staly rezistentními na většinu přírodních antimikrobiálních sloučenin včetně antibiotik. Je tedy zřejmé, že bychom měli vyvíjet aktivity, které by nás měly ochránit před nebezpečím mikroorganizmů rezistentních na antibiotika, a že je třeba vyvíjet nová antibiotika tak, abychom se ubránili selekci rezistentních patogenů, které se vynořují, jakmile se antibiotikum stává všeobecně klinicky aplikovaným léčivem. Některé z těchto problémů jsme již dříve diskutovali. (Demain a Spizek 2012, Rezanka a kol. 2007, Spizek a kol. 2010).

Příprava nových vakcín proti rezistentním bakteriálním kmenům

Antibiotika a vakcíny jsou nezbytné pro zlepšování lidského zdraví. Vakcína (též očkovací látka nebo imunizační agens) je látka, jejíž vpravení do organizmu má zajistit navození jeho imunity proti specifické chorobě. Použití vakcín je velmi výhodné zejména proto, že dosud nebyly popsány žádné bakterie rezistentní vůči vakcínám. Vývoj nových vakcín je nepochybně slibná strategie proti rezistenci na antibiotika. Antibiotika velmi často nestačí na ochranu proti onemocnění a případně i úmrtí způsobenému rychlým a generalizovaným šířením infekcí zapříčiněných vícenásobně rezistentními bakteriemi. Vakcíny a antibiotika podstatně přispěly k ochraně lidského zdraví a prodlužování života. Pro léčení infikovaných pacientů je nezbytný rychlý účinek antibiotik. Také pokud je příčina onemocnění neznámá a v případech superinfekcí různými druhy bakterií, jeví se antibiotika jako nevyhnutelný terapeutický postup. Vakcíny totiž nejsou účinné u již infikovaných pacientů a jejich aktivita je obvykle omezena na poměrně úzké rozmezí patogenů.

Vakcíny však podstatně přispěly k eradikaci některých smrtelných infekčních nemocí a mohou navodit několikaletou nebo celoživotní imunitu proti infekcím. Přesto patří infekční nemoci celosvětově k hlavním příčinám úmrtí. To je hlavně proto, že se vynořují bakterie rezistentní na antibiotika a že nejsou k dispozici účinné látky, které by léčily několik infekcí současně. Navíc je třeba mít na paměti, že v rozvojovém světě není řada léků dostupná. Vývoj nových vakcín je slibný a nezbytný pro řešení těchto problémů. S vývojem nových přístupů a adjuvantů (adjuvans je anorganická nebo organická chemická látka anebo makromolekula, případně celé buňky některých usmrcených bakterií, které zesilují imunitní reakci na podaný antigen) je nyní možné připravit vakcíny prakticky proti každému patogenu.

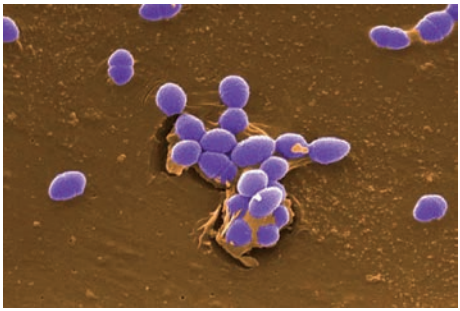
Zatímco bakterie rezistentní vůči vakcínám nebyly dosud nikdy popsány, existují literární údaje, že vakcinace může redukovat vznik kmenů rezistentních na antibiotika, protože snižuje užívání antibiotik. Vakcíny zcela nebo částečně vymýtily některé virové a bakteriální infekce. Jako příklady mohou sloužit eradikace neštovic, téměř úplná eliminace poliomyelitidy a více než 95% pokles výskytu nemocí, jako jsou

záškrt, tetanus, černý kašel, spalničky, příušnice a zarděnky. Se zavedením reverzní vakcinologie (genomový přístup ke konstrukci vakcín) a dalších metodologií, které dovolují účinnou identifikaci antigenů, mohou být vakcíny vyvíjeny na vysoké vědecké a kvalitativní úrovni. Biochemické, sérologické a mikrobiologické metody se používají pro analýzu patogenních mikroorganizmů a identifikaci komponentů vhodných pro vývoj vakcín. Genomické přístupy nyní umožňují předpovídat všechny antigeny, nezávisle na jejich hojnosti a imunogenicitě během infekce, aniž by patogen musel být nakultivován *in vitro*. To umožňuje vývoj vakcín pomocí nekonvenčních antigenů a při využití nekonvenčních zbraní imunitního systému. Vývoj mnoha vakcín, který dosud nebyl možný, se nyní stává realitou. Protože proces vývoje vakcín začíná *in silico*, pouze s využitím genetické informace, a nikoli patogenu samotného, nazývá se **reverzní vakcinologie**.

Jak vakcíny, tak antibiotika mají a stále budou mít význam při globální ochraně lidského zdraví. Bohužel rezistence bakterií vůči antibiotikům trvale narůstá a rychlost, s jakou se objevují a vyvíjejí nová antibiotika, klesá. Vakcíny mohou podstatně zlepšit současnou situaci. Je důležité uvědomit si, že dosud nebyly připraveny vakcíny proti nejdůležitějším multirezistentním kmenům bakterií. Díky reverzní vakcinologii, novým adjuvantům a pokroku v genomice je nyní možné připravit vakcíny proti jakýmkoli patogenům. Genové biotechnologie a integrativní biologie zcela jistě urychlí identifikaci nových vakcín, jejichž vývoj byl zatím neúspěšný. Je možno očekávat, že nové vakcíny a antibiotika budou moci společně celosvětově snížit riziko infekčních onemocnění.

Hledání nových antibiotik

V našich předchozích přehledných článcích (Rezanka a spol. 2007, Spizek a spol. 2010) jsme stručně diskutovali několik postupů, které je možno používat při hledání nových antibiotik, tj. např. výzkum nových antibiotik z netradičních nebo méně tradičních zdrojů, studium sekvencí mikrobiálních genomů, hledání genů specifikujících



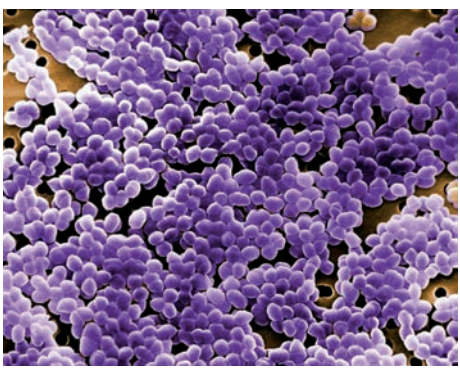
Obr. 5. ***Enterococcus faecalis*** **– kolorovaný snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu. Enterokoky jsou hlavními příčinami nosokomiálních bakteremií, postchirurgických infekcí a infekcí močových cest. Jsou rezistentní na většinu standardních antibiotických a jiných terapií**

biosyntézu antibiotik, analýzu DNA v prostředí, studium zapomenutých přirozených látek a jejich transformace a hledání nových zásahových míst pro antibiotika v patogenních bakteriích. V tomto článku se chceme ještě krátce zabývat nově schválenými antibiotiky a antibiotiky, jejichž výroba se připravuje.

Nově schválená antibiotika a antibiotika ve vývoji

Jako příklady látek ve fázi III klinického testování nebo hodnocených NDA/MAA (NDA – New Drug Application, USA; MAA / Marketing Authorization Application – EU) mohou sloužit fidaxomicin, amacyklin, oritavancin, dalbavancin a cethromycin, všechny odvozené z přírodních látek. Ve svém posledním přehledném článku Butler a spolupracovníci konstatují, že trvalý výskyt multirezistentních bakterií představuje velký problém a že pokračující vznik multirezistentních bakterií je pro veřejné zdraví velmi nebezpečný. Hledání a vývoj nových antibiotik, zejména antibiotik s novým mechanizmem účinku, jsou nezbytně nutné pro léčení takových infekcí (Butler a spol. 2013). Autoři ve svém článku zahrnuli 22 nových antibiotik získaných od roku 2000 a uvedli podrobnosti o dvou slibných antibiotikách fidaxomicinu a bedakvilinu, která mohou sloužit jako příklady.

Fidaxomicin je úzkospektré makrocyklické antibiotikum produkované aktinomycetou *Dactylosporangium aurantiacum*. Je to baktericidní (bakterie zabíjející) antibiotikum s aktivitou proti patogennímu *Clostridium difficile*. Zatím se pro léčení infekcí způsobených touto bakterií používaly pouze metronidazol a vankomycin. Fidaxomicin vykazuje lepší léčivé účinky než vankomycin a recidiva je méně častá. Bedakvilin je diaryl-chinolonové antituberkulózní léčivo. **Je to první lék proti tuberkulóze (TB) po 40 letech,** který je vhodný pro léčení TB pacientů infikovaných bakteriemi rezistentními na rifampicin a isoniazid.

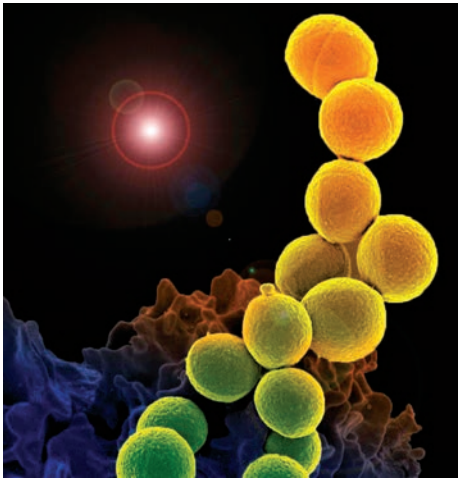


Obr. 6. ***Enterococcus* sp. Digitálně obarvený snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu. Je vidět velké množství grampozitivních bakterií**

Boucher a spolupracovníci shrnuli vývoj nových antibiotik a schvalování systémových antibiotik ve Spojených státech od počátku roku 2013 (Boucher a spol. 2013). Od zprávy Americké společnosti pro infekční nemoci (Infectious Diseases Society of America – IDSA) za rok 2009 byla schválena pouze dvě nová antibiotika a počet každoročně schvalovaných nových antibiotik ve Spojených státech se trvale snižuje. Autoři popsali sedm léčiv v klinickém vývoji, určených pro léčení infekcí způsobených rezistentními gramnegativními bakteriemi. Žádná z těchto sloučenin nebyla původně zahrnuta v jejich seznamu antibakteriálních sloučenin ve fázi II nebo v pozdější fázi vývoje v roce 2009, protože se bohužel žádná z těchto látek nehodila na léčení celého spektra infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi (GNB). Autoři konstatují, že určitý pokrok ve vývoji nových antibakteriálních léčiv na onemocnění způsobená gramnegativními bakteriemi je sice možno pozorovat, ale že pořád zůstává znepokojivě pomalý.

Gould a Bal shrnuli vyvíjené sloučeniny včetně aminoglykosidů nové generace, chinolonů, nových β-laktamů a monobaktamů, ketolidů, tetracyklinů, nových glykopeptidů a nových inhibitorů efluxních pump (Gould a Bal 2013). Z neoglykosidů se plazmomicin zdá být velmi dobrým kandidátem. Inhibuje bakteriální proteosyntézu a má baktericidní aktivitu. Očekává se, že brzy budou dostupné údaje o výsledcích klinických testů ve fázi II.

Vyvíjí se řada chinolonů, které si ponechávají aktivitu proti kmenům rezistentním proti současným chinolonovým sloučeninám, jako jsou např. delafloxacin a nemonoxycin vykazující aktivitu vůči *Staphylococcus aureus*, zejména proti methicilin-rezistentním kmenům (MRSA). Další příbuzná sloučenina ACH 702, která patří mezi isothiazolo-chinolony, je vysoce účinná proti MRSA a také proti *Mycobacterium*



Obr. 7. *Staphylococcus aureus* – digitálně obarvený snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu. Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) způsobuje mnoho závažných onemocnění od infekcí kůže a poranění až po zápaly plic a infekce krve, které mohou způsobit sepsi a být smrtelné. Stafylokoky včetně MRSA patří k nejběžnějším příčinám infekcí pacientů ve zdravotnických zařízeních

tuberculosis, což je velmi důležité pro léčení komplikované tuberkulózy rezistentní na současné léky. Ve skupině nových oxazolidinových derivátů autoři popsali tedizolid a radezolid, které mají vyšší aktivitu proti stafylokokům, streptokokům a enterokokům než linezolid. Kromě těchto sloučenin jsou některé sloučeniny z této skupiny vyvíjeny jako antimykobakteriální látky, např. sutezolid.

Ve skupině nových β-laktamů a monobaktamů je třeba jmenovat ceftarolin, což je cefalosporin páté generace, který má aktivitu proti MRSA a vankomycin-rezistentním *S. aureus*, přičemž je tato jeho poslední vlastnost výjimečná. Vyvíjí se také nové sloučeniny inhibující β-laktamázy. Mezi nimi má avibaktam široké spektrum aktivity včetně aktivity proti karbapenemázám. Nové ketolidy zahrnují cetromycin a solitromycin. Cetromycin byl FDA schválen jako prostředek proti možným bioteroristickým agens, jako jsou např. anthrax a mor. Na základě *in vitro* studií se solitromycinem je možno doufat, že jeho hlavní aplikace by mohly být při léčení kůže a měkkých tkání a pneumonie na jednotkách intenzivní péče.

Mezi tetracykliny je třeba uvést tigecyklin, což je širokospektrý glycylglycin, který již byl schválen pro klinické použití. Je možno jej používat při léčení různých smíšených infekcí způsobených patogeny rezistentními na běžné tetracykliny. Jeho hlavní výhodou je to, že neslouží jako substrát pro efluxní rezistenci nebo ochranné ribozomální proteiny, což jsou mechanizmy zodpovědné za rezistenci na tetracykliny. Byly rovněž popsány nové glykopeptidy telavancin a oritavancin. Oritavancin bude ještě dále klinicky testován. Inhibitory efluxních pump jsou nové sloučeniny, které ovlivňují efluxní pumpy v bakteriálních buňkách, vypuzující intracelulární antibiotika ven z buňky do prostředí.

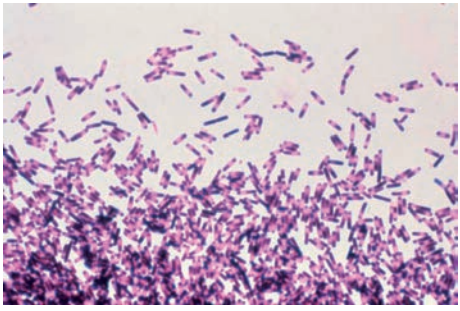
Hledání nových antibiotik v netradičních nebo méně tradičních zdrojích

Nové zdroje antibiotik se hledají v extrémních lokalitách, jako jsou horké prameny, podmořské hlubinné prameny nebo vodní rezervoáry s vysokým obsahem solí. Mořská aktinomyceta *Salinospora* je zvláště bohatým zdrojem nových chemických struktur se slibnými biologickými aktivitami. Nová léčiva, zejména antibiotika, jsou velmi potřebná a nejpříznivějším zdrojem jsou ještě pořád přírodní látky. Využívání nových zdrojů biologicky aktivních přírodních látek, zejména z mořského prostředí, zasluhuje zvláštní pozornost, především vzhledem k obrovské různorodosti mikroorganizmů a jejich metabolických produktů. Zprávy o nových chemických látkách a nadějných kandidátech léčiv produkovaných mořskými aktinobakteriemi ještě více podporují úvahy o tom, že tyto bakterie mají bezkonkurenční kapacitu tvořit využitelné přírodní látky. Mořská mikrobiologie se bouřlivě vyvíjí v mnoha zemích různých částí světa. Více než 67 % přírodních mořských produktů bylo nalezeno v Austrálii, v karibské oblasti, v Indickém

oceánu, v Japonsku, ve Středozemí a v západním Pacifiku. Mořské prostředí poskytlo mnoho nových přírodních látek s biologickými účinky a mořské přírodní látky mají nesmírnou důležitost při hledání nových léčiv. Cytotoxické vlastnosti mnoha takových sekundárních metabolitů jsou velmi důležité při hledání nových protinádorových látek.

Mořské sinice jsou rovněž významným zdrojem biologicky aktivních látek. Antibiotika se izolují většinou ze suchozemských půdních zdrojů nebo se vyrábějí synteticky z intermediátů. Oceán představuje dosud nedokonale prozkoumaný zdroj a bude to nejspíš právě mořský svět, který bude zásobovat farmaceutický průmysl novou generací antibiotik. „Mořská" antibiotika jsou produkována mořskými bakteriemi (aplasmomycin, hymalomyciny a pelagomyciny), aktinomycetami (marinomyciny C a D), řasami (cykloeudesmol, aeroplysinin-1(+), prepacifenol, tetrabromoheptanon), houbami (Ara C, variabilin, strobilin, ircinin-1, aeroplysin, 3,5-dibromo-4-hydroxyfenylacetamid), láčkovci (asperidol, andeunicin), měkkýši (laurinterol a pachydiktyol), pláštěnci (geranylhydrochinon a cystadytiny) a červy (thiolepin a 3,5-dibromo-4-hydroxy-benzaldehyd). Ukazuje se tedy, že mořské prostředí, které představuje přibližně polovinu globální rozmanitosti organizmů, je obrovským zdrojem nových antibiotik a že tento zdroj je třeba využívat při hledání nové generace těchto sloučenin.

Mořské organizmy mají některé vlastnosti, které je v mnoha ohledech odlišují od suchozemských organizmů, jako např. metabolizmus, chování, přenos informace a adaptační strategie. Dosud získané údaje byly zpracovány statisticky Hu a spolupracovníky (Hu a spol. 2011), kteří zjistili, že na rozdíl od suchozemských se mořské organizmy musí adaptovat na extrémní podmínky prostředí, jako jsou vysoký tlak, vysoká koncentrace solí, nízká koncentrace živin, nízká, ale stálá teplota, a že tyto rozdíly jsou zodpovědné za různorodost sekundárního metabolizmu mořských organizmů. Je zajímavé, že z mořských řas byla izolována řada multihalogenovaných sloučenin, které mají významnou biologickou aktivitu. Protože jsou průmyslová kultivace a aplikace genové technologie nyní relativně snadné, tvoří mořské mikroorganizmy nejslibnější oblast pro vývoj nových léčiv. Oceány, které hostí přibližně 87 % života na Zemi, mají vysoký potenciál pro získávání nových farmaceuticky významných látek.



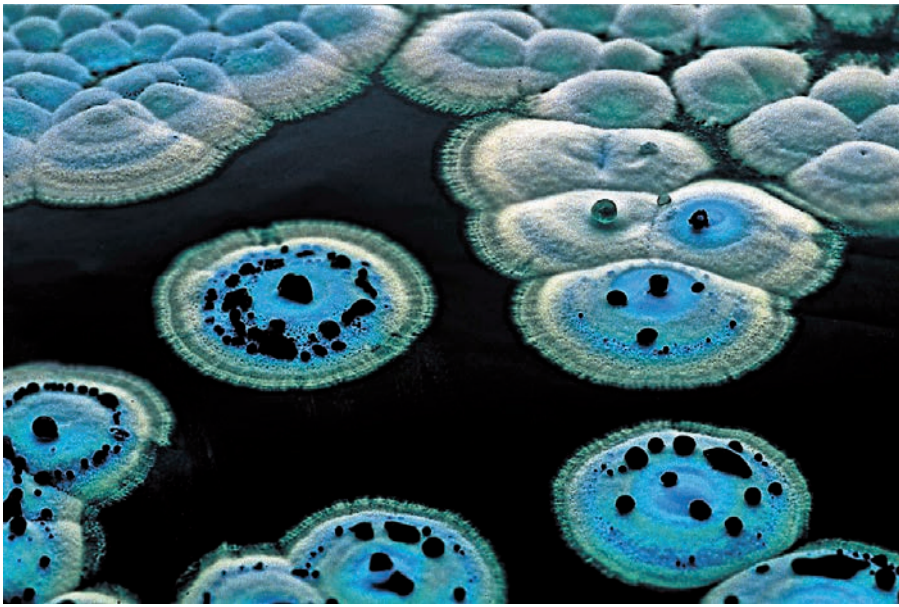
Obr. 8. ***Clostridium difficile*** **– mikroskopický snímek pořízený ze 72h stěru na anaerobním krevním agaru.** ***Clostridium difficile*** **je sporulující bakterie, která bývá složkou normální střevní mikroflory. Způsobuje pseudomembranózní kolitidu a průjmy. Tmavší terminální konce tyčinkovitých buněk jsou spory**

Genové sekvence mikroorganizmů – hledání genů specifikujících biosyntézu antibiotik

Informace o složení mikrobiálních genomů je možno využívat pro získávání nových sekundárních metabolitů včetně antibiotik. „Těžení" mikrobiálních genomů je možno definovat jako proces převádění genových sekvencí specifikujících sekundární metabolity až na purifikované molekuly ve zkumavkách. Z neznámých důvodů jsou aktinomycety nesmírně plodné co do počtu antibiotik, která produkují. Asi 75 % antibiotik je produkováno aktinomycetami a z nich ještě 75 % jedním rodem *Streptomyces*. Kmeny *Streptomyces hygroscopicus* produkují téměř 200 antibiotik. Jeden kmen *Micromonospora* může produkovat 48 aminoglykosidů a kmeny *Streptomyces griseus* produkují více než 40 různých antibiotik (Demain 2014). Počty genů specifikujících polyketid syntázu I (PKS), neribozomální peptidovou syntázu (NRPS) nebo smíšenou PKS-NRPS v produkčním mikroorganizmu je možno využívat jako měřítko potenciálu pro tvorbu sekundárních metabolitů. Z toho jasně vyplývá, že aktinomycety jsou mezi mikroorganizmy s velkými genomy nejproduktivnější. Bylo zjištěno, že počet funkčních NRPS metabolických drah je možno odhadnout podle počtu homologů *mbtH* v mikrobiálním genomu. (*Gen mbtH* a jeho homology kódují proteiny, které jsou důležité pro řadu praktických aplikací včetně produkce přírodních a geneticky manipulovaných sekundárních metabolitů.) Díky tomuto zajímavému a chytrému přístupu bylo možno klasifikovat zvláště „nadané" aktinomycety produkující sekundární metabolity (Baltz 2014). Podle Baltze je zřejmé, že za posledních 50 let bylo z více než ~ 10^{26} jednotek aktinomycet tvořících kolonie (colony-forming units) a obývajících horních 10 cm půdy dosud testováno na produkci sekundárních metabolitů pouze ~ 10^{7}, a že je tedy ještě pořád možno využít velkou většinu aktinomycet.

V následujících odstavcích uvádíme příklady streptomycet s úplně sekvenovaným genomem.

1. *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley a spol. 2002) (obr. 3). Znalost úplné sekvence *S. coelicolor* podstatně zrychlila pokrok v chápání biosyntézy známých metabolitů nebo metabolitů, jejichž biosyntézu u *S. coelicolor* a jiných streptomycet bylo možno předpokládat. Ukázalo se, že streptomycety mají mnohem větší potenciál produkovat sekundární metabolity, než se původně předpokládalo. *Streptomyces* a příbuzné rody vláknitých grampozitivních aktinobakterií jsou vynikajícím zdrojem přírodních látek včetně sloučenin antibakteriálních, antifungálních, protinádorových a imunosupresivních, antihelmintik a insekticidů. Dostupnost úplné genomové sekvence podstatně urychlila identifikaci a charakterizaci metabolických cest sekundárních metabolitů u *S. coelicolor*. Sekundární metabolizmus u této streptomycety zřejmě zůstane ještě dlouho důležitým tématem současného i budoucího výzkumu. Cena téměř úplné



Obr. 3. *Streptomyces coelicolor* – kolonie typického zástupce rodu *Streptomyces*, který produkuje směs antibiotických látek (podle Hopwooda: Streptomyces in Nature and Medicine. *The Antibiotic Makers* 2007)

sekvenace bakteriálních genomů se trvale snižuje a metodologie vyvíjené pro „těžbu" nových metabolitů u *S. coelicolor* se nyní úspěšně aplikují i u jiných aktinobakterií. Tyto přístupy v budoucnosti nepochybně odkryjí celkový metabolický potenciál tohoto podivuhodného druhu bakterií.

2. *Streptomyces avermitilis*. Bylo zjištěno, že genom *Streptomyces avermitilis* obsahuje nejméně 38 genových klastrů specifikujících sekundární metabolity a 46 inzerčních sekvencí, které dosud nebyly studovány. Heterologní exprese více než 20 exogenních genových klastrů ukázala, že je možné připravit mutanty *Streptomyces avermitilis* s velkými delecemi. Autoři nalezli biosyntetické genové klastry kódující polyketidové sloučeniny, peptidy, terpeny a biosyntetické klastry kódující další sloučeniny a tak ukázali, že *Streptomyces avermitilis* může být využit jako bohatý zdroj antibiotik a dalších biologicky aktivních látek (Ikeda a spol. 2014). Zde stojí za zmínku, že *S. avermitilis* produkuje avermektiny popsané Omurou a izolované Campbellem, za což v tomto roce tito autoři získali Nobelovu cenu za medicínu, a to spolu s Číňankou You You Tu (za objev antimalarického artemisininu).

3. *Streptomyces griseus* (Ohnishi a spol. 2008). Byla stanovena úplná genová sekvence *Streptomyces griseus* IFO 13350, půdní bakterie produkující antituberkulostatické antibiotikum streptomycin. Streptomycin je první aminoglykosidické antibiotikum objevené již před více než 60 lety. Srovnání genomů dvou příbuzných druhů *Streptomyces coelicolor* A3(2) a *Streptomyces avermitilis* odhalilo nikoli pouze charakteristiky genomu *S. griseus*, ale také existenci 24 genů pro specifické proteiny rodu *Streptomyces*. Genom *Streptomyces griseus* obsahuje 34 genových klastrů anebo genů pro biosyntézu známých nebo neznámých sekundárních metabolitů. Transkripční analýza ukázala, že kromě streptomycinového biosyntetického klastru jsou nejméně čtyři další klastry aktivovány přímo nebo nepřímo AdpA, ústředním transkripčním aktivátorem sekundárního metabolizmu a morfogeneze v regulační kaskádě faktoru A, což je γ-butyrolaktonová signální molekula.
4. *Streptomyces scabies* 87–22 (Bignell a spol. 2010). *Streptomyces scabies* je rostlinný patogen, který způsobuje strupovitost ekonomicky významných okopanin. Byla stanovena genová sekvence *Streptomyces scabies* 87–22 a byl identifikován biosyntetický genový klastr, o kterém se předpokládá, že specifikuje syntézu nové sloučeniny podobné CFA (coronafacic acid), složky virulenčního koronatinového fytotoxinu produkovaného rostlinnou patogenní bakterií *Pseudomonas syringae*. Southernova hybridizace ukázala, že *cfa*-podobný klastr u *S. scabies* 87–22 je pravděpodobně zachován i u dalších kmenů *S. scabies*, ale nenachází se u dvou dalších patogenních streptomycet, *S. turgidiscabies* a *S. acidiscabies*. Transkripční analýza dále ukázala, že klastr se exprimuje během interakce mezi mikrobem a rostlinou a že exprese vyžaduje transkripční regulátor ponořený jak v klastru, tak v *bldA* transferové RNA (*bldA* geny jsou zodpovědné za některé typy morfologické diferenciace u streptomycet. Jedná se zejména o tvorbu mycelia bez vzdušných spor, na pevném médiu, tedy „bald" – holého či „plešatého"). Ve srovnání s divokým kmenem měl kmen, u kterého byl biosyntetický klastr vyřazen, na sazenicích tabáku částečně potlačený virulenční fenotyp. U *S. scabies* tedy existuje biosyntetický klastr zodpovědný za interakce mezi hostitelem a patogenem.
5. *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 (Barbe a spol. 2011). *Streptomyces cattleya*, producent antibiotik thienamycinu a cefamycinu, je jedním z mála mikroorganizmů produkujících fluorované metabolity. Jeho kompletní genom byl analyzován a zjistilo se, že obsahuje dva lineární replikony. Geny, které se účastní metabolizmu fluoru a biosyntézy antibiotika thienamycinu, byly zmapovány na obou replikonech. *S. cattleya* se používá jako příhodný model jak pro charakterizaci enzymu zodpovědného za fluorační krok a jeho substrát, tak za metabolickou dráhu vedoucí k 4-fluorothreoninu.
6. *Streptomyces bingchenggensis* (Wang a spol. 2013). *Streptomyces bingchenggensis* je půdní bakterie produkující milbemyciny, skupinu makrolidových antibiotik,

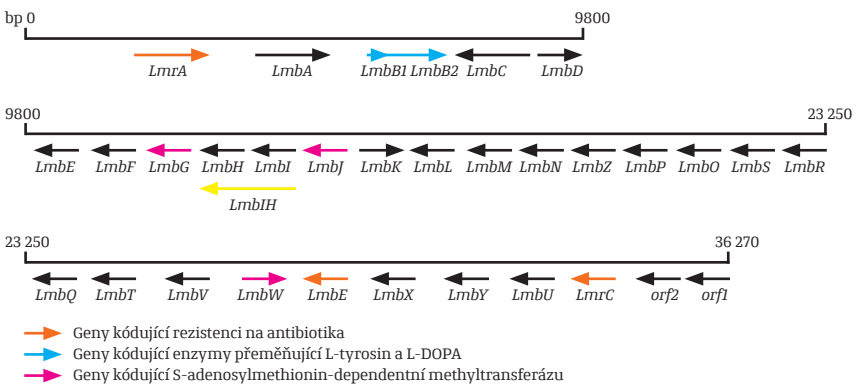
která jsou komerčně významná při ochraně obilovin a ve veterinární medicíně. *S. bingchenggensis* navíc produkuje mnoho přírodních látek včetně polyéteru nanchangmycinu a nových cyklických pentapeptidů. Celý genom *S. bingchenggensis* byl osekvenován a jeho transkriptomový profil byl následně studován pomocí postupů „microarray" s cílem identifikovat genové klastry, které jsou zodpovědné za biosyntézu těchto sloučenin, a lépe poznat biochemické dráhy specifikované těmito genovými klastry. Transkripční analýza prokázala extrémně vysokou hladinu exprese nanchangmycinového genového klastru během časných hodin kultivace, která se následně snižuje. Jiné genové klastry se však neexprimují. Celogenomová analýza genových klastrů *S. bingchenggensis* spolu s transkripční analýzou nepochybně umožní racionální vývoj vysokoprodukčních milbemycinových kmenů, a tak nejspíše povede k objevu nových přírodních látek.

Domníváme se, že analýza genů specifikujících biosyntézu antibiotik by se měla využívat při vývoji nových derivátů antibiotik, které by byly účinné proti bakteriálním kmenům rezistentním na současně používaná antibiotika. Podle údajů databáze komparativní analýzy mikrobiálních genomů (Microbial Genome Database for Comparative Analysis) bylo již sekvenováno celkem 18 genomů rodu *Streptomyces* včetně *Streptomyces albus*, *S. collinus*, *S. davawensis*, *S. flavogriseus*, *S. fulvissimus* a různých kmenů *S. hygroscopicus*, *S. venezuelae* a *S. violaceusniger*. Tyto rozsáhlé znalosti je zcela jistě možno využít při hledání nových antibiotik.

Jako příklad je možno uvést linkomycinový genový klastr, který specifikuje biosyntézu antibiotika linkomycinu (obr. 4). Linkomycin a jeho deriváty jsou antibiotika, která vykazují aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Klindamycin, chlorovaný derivát linkomycinu, se používá v klinické praxi při léčení infekcí způsobených anaerobními bakteriemi. Šipky na obrázku ukazují směr transkripce jednotlivých genů. Produkty genů *lmbH–lmbK* se podobají genům metabolizmu aminokyselin. Produkty genů *lmbL–LmbQ* jsou pravděpodobně enzymy metabolizmu cukrů. Znalost struktury genových klastrů umožňuje připravovat modifikace těchto enzymů, a tak také indukovat produkci modifikovaných antibiotik.

Zapomenutá antibiotika, která by mohla a měla být revitalizována

Během „zlatého věku" antibiotik byly objeveny tisíce biologicky aktivních sloučenin. Mnohé z nich však nebyly využity buď proto, že v té době byly již k dispozici lepší sloučeniny, nebo proto, že z nich nemohla být vyvinuta léčiva vzhledem k jejich nepříznivým farmakologickým vlastnostem. Pulcini a spolupracovníci ve svém souhrnném



Produkty genů LmbA–LmbK se podobají enzymům metabolizmu aminokyselin
Produkty genů LmbL–LmbQ jsou pravděpodobně enzymy cukerného metabolizmu

Obr. 4. Linkomycinový genový klastr. Oranžově jsou vyznačeny geny kódující rezistenci na antibiotika, růžově geny kódující S-adenosyl-dependentní methyltransferázu. Produkty genů *lmbH–lmbK* se podobají genům metabolizmu aminokyselin. Produkty genů *lmbL–LmbQ* jsou pravděpodobně enzymy metabolizmu cukrů

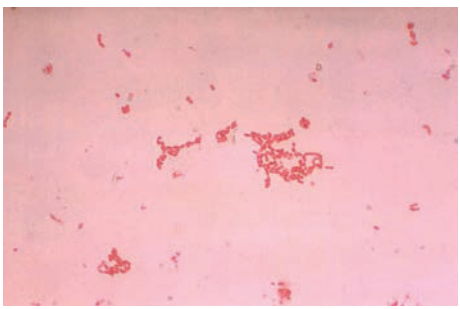
článku navrhují, abychom v souvislosti se šířením rezistence na antibiotika a nedostatkem nových antibiotik obrátili pozornost k potenciálně užitečným starším antibiotikům. Mnoho potenciálně užitečných antibiotik, obvykle laciných a na trhu dostupných jako generika, o kterých se ví, že jsou dobře tolerována a že jsou bezpečná, není nyní v některých zemích dostupných. Autoři upozorňují, že by některé sloučeniny jako např. temocillin a mecillinam mohly být užitečné proti bakteriím produkujícím β-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku. Bylo by také možné použít fosfomycin a kolistin při léčení infekcí způsobených gramnegativními bacily rezistentními na karbapenem. Například 31 zvláště užitečných antibiotik je v omezených množstvích dostupných v některých zemích. Autoři tvrdí, že je třeba „zajistit lepší dostupnost těchto antibiotik v globálním měřítku a provádět další výzkum, který by se týkal výhodnosti těchto antibiotik při léčení současných klinických infekcí".

Freire-Moran se spolupracovníky shrnuli sloučeniny, které jsou v klinickém vývoji a které by se mohly dostat na trh v příštích 5–10 letech (Freire-Moran a spol. 2011). Popsali 66 nových aktivních sloučenin, z nichž 27 mělo nový mechanizmus účinku

nebo nové zásahové místo. Zbývajících 39 látek náleželo ke známým antimikrobiálním sloučeninám nebo skupinám sloučenin, jako jsou např. chinolony (15 sloučenin), β-laktamy (6), oxazolidiny (3), diaminopyrimidiny (2), makrolidy (2), pleuromutiliny (2), aminoglykosidy (1), ansamyciny (1), inhibitor FabI (1), glykopeptidy (1), kovové ionty (1) streptogramin (1), tetracyklin (1) a hybridní látky typu oxazolidinon/chinolon a rifamycin/fluorochinolon (2). Uvažovalo se o nich tak, že účinkují na stejné zásahové místo jako alespoň jedna již dříve produkovaná antibakteriální sloučenina – proto tyto sloučeniny nebyly používány v dalších studiích. Z 27 nových aktivních sloučenin s novým mechanizmem účinku nebo s novým zásahovým místem se ukazuje 15 sloučenin, které by mohly být systematicky užívány při léčení vážných invazivních



Obr. 9a. ***Acinetobacter baumannii*** **– kolorovaný snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu.** ***Acinetobacter*** **se nachází v půdě a vodě. Existuje mnoho druhů této bakterie a řada z nich způsobuje onemocnění lidí. Bakterie** ***Acinetobacter baumannii*** **je zodpovědná za 80 % popisovaných infekcí. Infekce způsobené touto bakterií se vyskytují zejména na jednotkách intenzivní péče a v dalších zdravotnických zařízeních, kde ohrožují zejména vážně nemocné pacienty. Mimo ně se tyto infekce vyskytují jen velmi vzácně**



Obr. 9b. ***Acinetobacter baumannii*** **– mikroskopický snímek**

infekcí. Z těchto 15 sloučenin se o 13 uvažovalo, že vykazují aktivitu proti nejméně jedné z vybraných grampozitivních bakterií rezistentních na antibiotika, a 8 by mohlo působit proti nejméně jedné z vybraných gramnegativních bakterií rezistentních na antibiotika. Nejčastěji se těmito sloučeninami daly léčit infekce způsobené MRSA (13 z 15), zatímco nejméně často jimi mohly být léčeny infekce způsobené VRE (5 z 15). Z 8 sloučenin s aktivitou proti gramnegativním bakteriím rezistentním na antibiotika měly 4 předpokládanou aktivitu založenou na známých vlastnostech této třídy nebo na známých mechanizmech účinku. Ze 4 sloučenin s aktivitou proti gramnegativním bakteriím rezistentním na antibiotika 2 sloučeniny účinkovaly na nová nebo pravděpodobně nová zásahová místa nebo měly nové mechanizmy účinku.

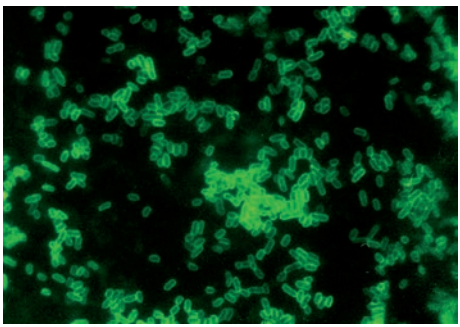
Nová zásahová místa pro antibiotika

Informace o genomech důležitých patogenních bakterií, jako jsou *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*, by nám určitě měly pomoci při hledání nových zásahových míst pro antibiotika u těchto patogenů. Sekvence mnoha set genomů patogenních mikroorganizmů jsou již známé a mnoho dalších projektů je v běhu. Boucher a spolupracovníci shrnuli výhledy při vývoji nových sloučenin proti patogenním mikroorganizmům včetně nových zásahových míst (Boucher a spol. 2013). Podle těchto autorů se frekvence infekcí způsobených bakteriemi rezistentními na antibiotika, zejména ESCAPE patogeny, trvale zvyšuje a tyto patogeny způsobují výraznou morbiditu a mortalitu. Nové antibakteriální sloučeniny jsou nejpotřebnější pro léčení infekcí způsobených gramnegativními bacily (GNB) rezistentními vůči současným antibiotikům. Americká společnost pro infekční choroby (The Infectious Diseases Society of America – IDSA) navrhuje legislativní, kontrolní a finanční řešení této pokračující krize. V nedávné zprávě aktualizovala stav vývoje a schvalování systémových antibiotik ve Spojených státech do roku 2013. Pouze dvě nová antibiotika

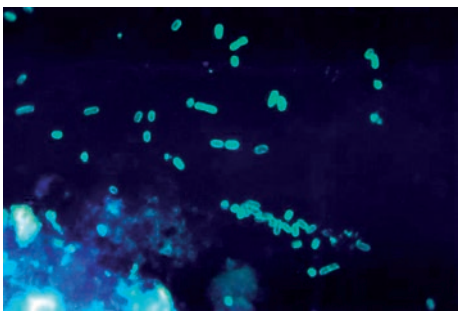


Obr. 10. ***Pseudomonas aeruginosa*** **– kolorovaný snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu.** ***P. aeruginosa*** **běžně způsobuje nemocniční infekce, jako jsou pneumonie, infekce krevního oběhu, infekce močových cest a infekce chirurgických ran**

byla podle zprávy IDSA schválena do konce roku 2009 a počet nových antibiotik ročně schvalovaných pro americký trh se trvale snižuje. V této studii bylo zjištěno, že sedm sloučenin pro léčení infekcí GNB rezistentními na antibiotika je v klinickém vývoji. Žádné z těchto léčiv nebylo zahrnuto v seznamu antibakteriálních sloučenin ve fázi II nebo i pozdějších fázích vývoje pro rok 2009 a navíc žádná z těchto sloučenin nebyla směrována na klinicky významné rezistentní GNB. Ve zmiňované zprávě se ukázalo, že existuje určitý pokrok ve vývoji nových antibakteriálních léčiv proti rezistentním GNB, ale že je to pokrok znepokojivě pomalý. A tak IDSA zdůrazňuje přesvědčení Bouchera a spolupracovníků (Boucher a spol. 2013), že problém antibiotik ve vývoji může být řešen na základě spolupráce globálních hráčů s cílem stimulovat výzkum a vývoj nových antibakteriálních antibiotik. Podle těchto autorů by měl být podporován udržitelný globální výzkum antibakteriálních látek a rozvoj podnikání v této oblasti s cílem vyvinout do roku 2020 deset nových, bezpečných, účinných a systematicky aplikovatelných antibiotik podle iniciativy „IDSA 10 × 20“.



Obr. 11a. ***Escherichia coli*** **v mozkomíšní tekutině – fluorescenční značení**



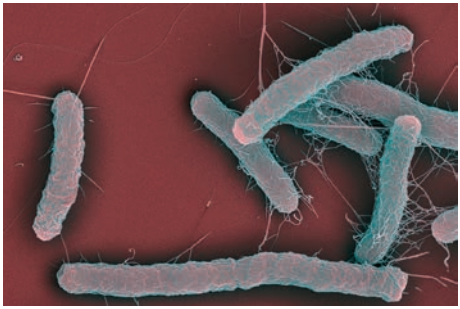
Obr. 11b. ***Escherichia coli*** **– značení fluorescenčními protilátkami. Jedná se enteropatogenní *Escherichia coli* (EEC), O127:B8. *E. coli* je různorodá skupina bakterií. Většina kmenů je neškodných, jiné jsou patogenní a způsobují průjmy, jiné infekce močových cest, některé jiné respirační onemocnění a zápaly plic**

Obrázky mikroorganizmů č. 7, 9a a 10 použité v tomto článku byly se souhlasem převzaty z Public Health Image Library (PHIL), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA.

Bakheet a Doig (2010) analyzovali 48 zásahových proteinů (proteinů, na něž se antibiotika specificky vážou) pro antibiotika ze všech bakterií, 22 zásahových proteinů pouze z *E. coli* a 4243 zásahových míst jiných než pro antibiotika rovněž u *E. coli*, s cílem identifikovat rozdíly v jejich vlastnostech a předpovědět nová potenciální zásahová místa pro antibiotika. Zjistili, že ve srovnání s „nezásahovými" proteiny jsou bakteriální „zásahové" proteiny pro antibiotika dlouhé, mají vysoký obsah β-skládaného listu (beta-sheet) a nízký obsah α-helixu, jsou polární, nacházejí se více v cytoplazmě než v membráně a jsou to obvykle enzymy, velmi často ligázy. (β-skládaný list se nachází v mnoha bílkovinách a sestává ze dvou nebo více paralelních polypeptidových řetězců uspořádaných tak, že se mezi nimi mohou tvořit vodíkové můstky, na rozdíl od α-helixu, v němž aminokyseliny tvoří spirálu; v β-skládaném listu jsou bílkoviny uspořádány „cik-cak" a tvoří rovný řetězec.) Autoři použili sekvenční vlastnosti těchto proteinů a vytvořili model proteinů u *E. coli*, který umožňuje zařazení jakékoli sekvence do třídy „zásahové" a „nezásahové" s přesností 94 %. Identifikovali 319 proteinů v „nezásahové" sadě, které mají „zásahové" vlastnosti a z nichž některé mají neznámou funkci. Z těchto proteinů má 63 významnou a nežádoucí podobnost s proteiny lidskými, což ponechává 256 „zásahových" proteinů, které se nenacházejí u lidí. Autoři se domnívají, že vyhledávací programy na nová antibiotika by mohly být úspěšnější, kdyby se vybrala nová zásahová místa z této sady proteinů podobných „zásahovým" nebo jejich homologům. Bylo nalezeno 64 esenciálních genů, jejichž inzerční poškození je pro buňku letální. Zdá se, že výše popsaný bioinformatický výzkum bude velmi potřebný pro úspěšné hledání nových antibiotik.

Diskuse a závěry

Rezistence mikroorganizmů na antibiotika trvale narůstá a představuje celosvětové ohrožení lidského zdraví. Zdá se, že výskyt a šíření bakterií rezistentních na antibiotika odráží darwinovskou evoluci. Většinou se citlivost na antibiotika mírně snižuje a je



Obr. 12. *Escherichia coli*. Elektronová mikroskopie (foto Oldřich Benada, Mikrobiologický ústav AV ČR)

možno pozorovat fenotypy, které není možno přesně charakterizovat jako rezistenci, ale také náhlé změny od úplné citlivosti k úplné rezistenci, které jsou řízeny širokou škálou mechanizmů horizontálního genového přenosu. Antibiotika zřejmě selektují více než pouhou rezistenci na antibiotika (např. také zvýšenou virulenci a schopnost genetické výměny) a mnohá neantibiotická agens nebo podmínky selektují nebo udržují znaky rezistence na antibiotika jako výsledek složité sítě podpůrných a často se překrývajících mechanizmů. Boj s rezistencí na antibiotika je tak velmi komplikovaný a nikdy nekončící proces. Zdá se, že boj s rezistencí na antibiotika je válka, která se nedá nikdy vyhrát. Schopnosti obrovského množství mikrobů spolu s evolučními silami překonávají naše léčiva. Tváří v tvář tomuto ohrožení však nesmíme zůstat bezmocní. Odhaduje se, že bylo popsáno asi 80 000–100 000 antibiotik, z nichž se pouze asi 150 klinicky používá. Je to hlavně proto, že některá antibiotika jsou příliš toxická nebo špatně rozpustná ve vodě nebo mají jiné farmakologicky nevhodné vlastnosti, případně mají stejné účinky jako antibiotika, která se v klinické praxi už používají. Má tedy vůbec ještě smysl hledat nová antibiotika, která by nám pomáhala při léčení infekcí rezistentních na současně používaná antibiotika? Podle Daviese a Daviesové (2010) se důležitost a hodnota antibiotik pořád ještě nedoceňují; při léčení



Obr. 13a. ***Escherichia coli*** **– bičíky. Elektronová mikroskopie**
(foto Oldřich Benada, Mikrobiologický ústav AV ČR)

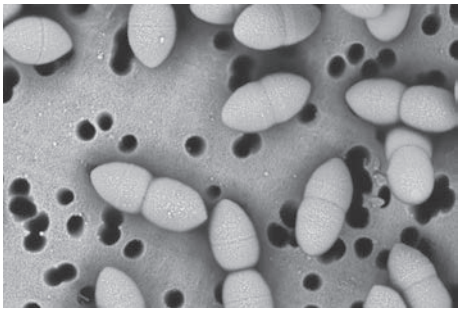


Obr. 13b. ***Escherichia coli*** **– fimbrie. Elektronová mikroskopie**
(foto Oldřich Benada, Mikrobiologický ústav AV ČR)

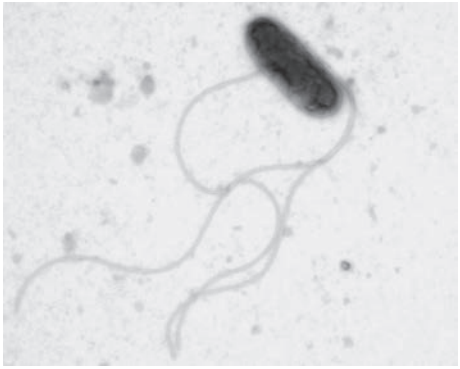
infekčních nemocí jsme na nich zcela závislí a neměli bychom je pokládat za pouhé komodity. Kromě využití při léčení infekčních nemocí jsou antibiotika nezbytná pro pokročilé chirurgické zákroky včetně transplantace orgánů a umělých kloubních náhrad.

Celá léta antibiotika představovala efektivní prostředky pro léčení mnoha infekčních nemocí způsobených mikroorganizmy. Jak jsme však již několikrát zmínili, počet mikroorganizmů, které se přizpůsobily nyní používaným antibiotikům, se dramaticky zvyšuje. Hledat a vyvíjet nová antibiotika je však velmi náročné a je ještě obtížnější je uplatnit na trhu zejména proto, že mnoho farmaceutických společností ztratilo o antibiotika zájem. Zdá se, že s příchodem sekvenování genomů produkčních mikroorganizmů a jejich využití jsou zde při hledání nových antibiotik nové slibné možnosti (Schaeffler a spol. 2013).

Je zřejmé, že nová antibiotika jsou velmi potřebná. Pravděpodobně jejich nejslibnější zdroj ještě pořád představují přírodní produkty mikroorganizmů. Podle starého, ale stále ještě zajímavého modelu Watveho a spolupracovníků by mělo být ještě možné nalézt 294 300 sloučenin, které nebyly dosud popsány (Watve a spol. 2001); dokonce i podle mnohem konzervativnějších odhadů by ještě pořád mohlo být izolováno



Obr. 14. ***Streptococcus pneumoniae.*** **Elektronová mikroskopie**
(foto Oldřich Benada, Mikrobiologický ústav AV ČR)



Obr. 15. ***Pseudomonas aeruginosa*** **– bičíky. Elektronová mikroskopie**
(foto Oldřich Benada, Mikrobiologický ústav AV ČR)

150 000 nových sloučenin. I když je tento model některými matematiky zpochybňován, můžeme zcela realisticky odhadovat, že dosud se podařilo izolovat pouze asi 3 % antibiotik produkovaných streptomycetami. Zdá se, že pomocí moderních, sofistikovaných metod je pořád ještě možno nalézat nové skupiny chemických sloučenin včetně antibiotik.

Hledání nových antimikrobních látek je naprostá nezbytnost, i když to vypadá, že velké farmaceutické společnosti se o ně moc nezajímají. Je zřejmé, že v patogenních mikroorganizmech jsou ještě zásahová místa, která dosud nebyla studována. Se zvyšujícím se využitím znalostí o genomech mikroorganizmů je možno očekávat, že budou nalezena další zásahová místa pro antibiotika. K tomu bude třeba spojit úsilí akademické obce s průmyslem. Podle Daviese a Daviesové (2010) musíme obnovit soustředěné úsilí a zaměřit se na rezistenci vůči antibiotikům, jinak by naši potomci mohli žít v preantibiotickém období.

Slovníček pojmů

Adjuvans je anorganická nebo organická chemická látka, makromolekula, případně celé buňky některých usmrcených bakterií, které zesilují imunitní reakci na podaný antigen.

Inzerční sekvence je část genomu (několik set nukleotidových párů), která se přemisťuje z jednoho místa na jiné téhož nebo jiného genomu a může být příčinou jeho reorganizace.

Reverzní vakcinologie – genomické přístupy nyní umožňují předpovídat všechny antigeny (nezávisle na jejich hojnosti a imunogenicitě během infekce), aniž by patogen musel být nakultivován *in vitro*. To umožňuje vývoj vakcín pomocí nekonvenčních antigenů a při využití nekonvenčních zbraní imunitního systému. Protože proces vývoje vakcín začíná *in silico*, pouze s využitím genetické informace a nikoli patogenu samotného, nazývá se reverzní vakcinologie.

Vakcína (též očkovací látka nebo imunizační agens) je látka, jejíž vpravení do organizmu má zajistit navození jeho imunity proti specifické chorobě. Použití vakcín je velmi výhodné zejména proto, že dosud nebyly popsány žádné bakterie rezistentní vůči vakcínám.

Literatura

Bakheet, T. M., Doig, A. J. Properties and identification of antibiotic drug targets. *BMC Bioinformatics* 11, 2010, 195.

Baltz, R. H. MbtH homology codes to identify gifted microbes for genome mining. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 41, 2014, 357–369.

Barbe, V., Bouzon, M., Mangenot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B., Vallenet, D., Marliere, P., Weissenbach, J. Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *J. Bacteriol*. 193, 2011, 5055–5056.

Bennett, J. W. What is an Antibiotic? In Sanchez and Demain (eds.): *Antibiotics, Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015, s. 1–18.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 2002, 141–147.

Bignell, D. R. D., Seipke, R. F., Huguet-Tapia, J. C., Chambers, A. H., Parry, R. J., Loria, R. *Streptomyces scabies* 87–22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant–microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Int*. 23, 2010, 161–175.

Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Jr., Bradley, J., Guidos, R. J., Jones, R. N., Murray, B. E., Bonomo, R. A., Gilbert, D., pro Infect. Dis. Soc., A. 10 × '20 Progress-development of new drugs active against Gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*. 56, 2013, 1685–1694.

Butler, M. S., Blaskovich, M. A., Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot*. 66, 2013, 571–591.

Davies, J., Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 74, 2010, 417–433.

Demain, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 41, 2014, 185–201.

Demain, A. L., Spizek, J. The antibiotic crisis. In A. Tegos, E. Mylonakis (eds.): *Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies*. Wallingford, UK: CABI, 2012, s. 26–43.

Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I. C., So, A. D., Monnet, D. L., Cars, O., Grp, E.-E. W. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria: Time to react is now. *Drug Res. Updates* 14, 2011, 118–124.

Gould, I. M., Bal, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* 4, 2013, 185–191.

Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., Zhu, X., Lin, Y.-C., Chen, S.-P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs* 9, 2011, 514–525.

Ikeda, H., Shin-ya, K., Omura, S. Microbial genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized host for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 41, 2014.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol*. 190, 2008, 4050–4060.

Rezanka, T., Spizek, J., Sigler, K. Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. *Anti-Infect. Agents Med. Chem*. 6, 2007, 133–144.

Scheffler, R. J., Colmer, S., Tynan, H., Demain, A. L., Gullo, V. P. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97, 2013, 969–978.

Spizek, J., Novotna, J., Rezanka, T., Demain, A. L. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 37, 2010, 1241–1248.

Wang, X.-J., Zhang, B., Yan, Y.-J., An, J., Zhang, J., Liu, C.-X., Xiang, W.-S. Characterization and analysis of an industrial strain of *Streptomyces bingchenggensis* by genome sequencing and gene microarray. *Genome* 56, 2013, 677–689.

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol*. 176, 2001, 386–390.

Nová strategie Akademie věd České republiky

motto: *„Špičkový výzkum ve veřejném zájmu“*

Uplynulých dvacet let prokázalo, že Akademie věd je významnou a nenahraditelnou součástí systému výzkumu, vývoje a inovací České republiky. Nadále musí zůstat garantem kvality, avšak pro její další rozvoj je nezbytné, aby byla schopna identifikovat důležité vědecké a společenské otázky, fundovaným způsobem definovat problematiku a vypracovat návrhy řešení z hlediska současné úrovně dosaženého poznání. Akademie věd má již ve své dnešní podobě dobré základy pro to, aby v blízké budoucnosti mohla působit nejen jako součást špičkové světové vědy a centrum národní kultury, ale i jako stále důležitější hospodářský činitel.

Témata, jako jsou například energetická budoucnost České republiky, zdraví občanů nebo kvalita veřejných politik, představují složité okruhy problémů, jejichž řešení vyžaduje široce založený interdisciplinární výzkum. Akademie věd proto připravila Strategii AV21, jejímž základem je soubor koordinovaných výzkumných programů využívající mezioborových a meziinstitucionálních synergií s cílem identifikovat problémy a výzvy dnešní doby a koordinovat výzkumné úsilí pracovišť Akademie věd směrem k jejich řešení. Základní rámec strategie schválil Akademický sněm v prosinci 2014 s tím, že relevantní programy bude možné navrhovat i v dalším období. Výzkumné programy Akademie věd jsou od počátku otevřeny partnerům z vysokých škol, podnikatelské sféry a institucím státní a regionální správy, stejně jako zahraničním výzkumným skupinám a organizacím. Nezbytnou podmínkou pro uskutečňování Strategie AV21 je dlouhodobá stabilita systému výzkumu, vývoje a inovací v České republice.

Základním nástrojem pro realizaci Strategie AV21 je soubor koordinovaných výzkumných programů pracovišť Akademie věd:

- Naděje a rizika digitálního věku
- Systémy pro jadernou energetiku
- Účinná přeměna a skladování energie
- Přírodní hrozby
- Nové materiály na bázi kovů, keramik a kompozitů
- Diagnostické metody a techniky
- Kvalitní život ve zdraví i nemoci
- Potraviny pro budoucnost
- Rozmanitost života a zdraví ekosystémů
- Molekuly a materiály pro život
- Evropa a stát: mezi barbarstvím a civilizací
- Paměť v digitálním věku
- Efektivní veřejné politiky a současná společnost
- Formy a funkce komunikace

Důležitou součástí strategie je aktivita Aplikační laboratoře AV ČR, jejímž cílem je rozšířit přímé kontakty pracovišť Akademie věd s aplikační sférou. Strategie AV21 zároveň respektuje klíčovou roli základního výzkumu, který je ve všech vědeckých disciplínách podstatou jejich vývoje.

Koordinátory výzkumných programů jsou ředitelé zapojených pracovišť nebo pověření vědečtí pracovníci. Ti zajišťují vyhledávání nových, společensky relevantních témat výzkumu, provádějí syntézu dostupných informací a výsledků výzkumu z hlediska současné úrovně dosaženého poznání a koordinují vypracování návrhu výzkumného programu.

Výzkumné programy schvaluje Akademická rada v součinnosti s Vědeckou radou.

Program **Potraviny pro budoucnost** reaguje na významný společensko-ekonomický problém, a tím je riziko celosvětového nedostatku potravin, jejich kvalita, vliv na zdraví člověka a efektivita produkce.

Výzkumný program „Potraviny pro budoucnost" je zaměřený na:

- získávání nových poznatků o dědičné informaci rostlin, které pomohou při šlechtění odolnějších a kvalitnějších plodin
- molekulární technologie pro šlechtění hospodářských zvířat, produkci, zpracování a využití potravin živočišného původu
- prevenci nemocí trávicího traktu, především vlivu lepku i probiotik na zdraví člověka
- lepší využití mikrořas v potravě a řasových biotechnologií
- výzkum cenných látek rostlinného i živočišného původu a jejich využití
- hledání nových biotechnologických postupů, které by umožnily zpracování přírodních materiálů i bio-odpadů
- hledání příčin toho, proč lidé plýtvají potravinami, a přispění k omezení těchto ztrát.

Programu se účastní řada pracovišť AV ČR: Ústav experimentální botaniky, Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Ústav chemických procesů, Mikrobiologický ústav a Sociologický ústav.

Osobnosti a výzkumná témata

Koordinátor programu – Prof. Ing. Jaroslav Doležel DrSc. /ÚEB/
Genomika a biotechnologie rostlin pro efektivní šlechtění

Prof. MUDr. Helena Tlaskalová – Hogenová, DrSc. /MBÚ/
Nezávadnost nových zdrojů surovin pro bezlepkovou dietu a využití probiotik

Prof. RNDr. Ondřej Prášil, PhD. /MBÚ/
Využití mikrořas v potravě

Ing. Jan Kopečný DrSc. /ÚŽFG/
Molekulární technologie pro šlechtění zvířat

Ing. Olga Šolcová, CSc., DSc. /ÚCHP/
Separace cenných látek z rostlinných materiálů pro podporu zdravé výživy

PhDr. Martin Buchtík /SOÚ/
Spotřeba a plýtvání potravinami jako sociální problém

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Historie Mikrobiologického ústavu AV ČR začíná v roce 1948. Tehdy Ivan Málek, zakladatel Mikrobiologického ústavu, odešel z Prahy na Lékařskou fakultu Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde vytvořil pracovní skupinu, jež se stala základem Mikrobiologického oddělení Ústředního ústavu biologického. Když byla v roce 1952 založena Československá akademie věd, přešla tato skupina z Hradce Králové na Flemingovo náměstí v Praze-Dejvicích a bylo ustaveno Mikrobiologické oddělení Biologického ústavu ČSAV. Samostatný Mikrobiologický ústav ČSAV vznikl v roce 1962 a o dva roky později se přestěhoval do nové budovy v Praze-Krči.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., má nyní více než 600 zaměstnanců, z toho přibližně polovinu tvoří pracovníci s vysokoškolským vzděláním včetně více než stovky postgraduálních studentů. Během padesáti let své existence se Mikrobiologický ústav stal největším pracovištěm v České republice, které nejen komplexně studuje vlastnosti mikroorganizmů (bakterií, kvasinek, hub a řas) z hlediska základního výzkumu, ale věnuje se i jejich praktickému využití v průmyslu či medicíně, což vyústilo do mnoha biotechnologických aplikací. Hlavními směry výzkumu jsou buněčná a molekulární mikrobiologie, genetika a fyziologie mikroorganizmů a studium jejich rezistence vůči antibiotikům, produkce mikrobiálních metabolitů a jejich biotransformace a šlechtění produkčních kmenů. K důležitým oblastem patří mikrobiální ekologie a degradace organických polutantů. Část ústavu zaměřená na imunologickou problematiku se věnuje významu mikroorganizmů ve vývoji imunity a při vzniku autoimunitních chorob a imunoterapii nádorových onemocnění.

V Mikrobiologickém ústavu bylo nalezeno jediné původní československé antibiotikum mucidin. Je to antibiotikum produkované houbou slizečka porcelánová (*Oudemansiella mucida*). Ta patří mezi bazidiomycety a v přírodě se vyskytuje hlavně na ještě stojících mrtvých kmenech buků. S objevem antibiotika jsou spojena hlavně jména RNDr. Vladimíra Musílka, CSc., a RNDr. Václava Šaška, CSc. V Musílkově Oddělení experimentální mykologie zjistili, že slizečka porcelánová má výraznou protihoubovou aktivitu. Houbu bylo možno kultivovat v submerzních podmínkách nejprve v baňkách a následně v malých laboratorních fermentorech, kde byla naprodukována houbová biomasa pro základní charakteristiku antibiotické látky. Podle producenta bylo antibiotikum nazváno mucidin. Základní patentová přihláška, zahrnující aplikačně významné aspekty produkce mucidinu a některé další charakteristiky mucidinu, byla podána v roce 1965. Na základě spolupráce s RNDr. Miloslavem Vondráčkem z Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací v Roztokách u Prahy byl vyvinut postup izolace krystalického preparátu a byla vyřešena chemická struktura mucidinu. Patentová přihláška na způsob izolace mucidinu byla podána v r. 1967. Na základě kladných výsledků farmakologických a klinických testů povolily příslušné orgány Ministerstva zdravotnictví ČSR zahájení výroby mucidinu ve dvou aplikačních formách (Mucidermin spray, Mucidermin unguentum) pro externí terapii kožních mykóz. Několik let byl mucidin vyráběn a prodáván v lékárnách jako velmi úspěšné antibiotikum.

Podrobnosti o historii objevu mucidinu a jeho využití je možno nalézt v monografii o léčivých účincích hub (Antonín V., Jablonský I., Šašek V., Vančuříková Z.: ***Houby jako lék***. Ottovo nakladatelství, s. r. o., 2013, str. 51–53).

Prof. RNDr. Jaroslav Spížek, DrSc., vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. Je vědeckým pracovníkem Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., kde se zabývá fyziologií a genetikou aktinomycet a sekundárním metabolizmem. Na Přírodovědecké fakultě UK přednáší o antibioticích. Je voleným členem American Academy of Microbiology.

Akademie věd České republiky
Strategie AV21
Špičkový výzkum ve veřejném zájmu

Edice Strategie AV21 | Potraviny pro budoucnost

Jaroslav Spížek | **Boj s rezistencí na antibiotika**

Vydalo Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., pro Kancelář Akademie věd ČR,
Národní 3, 117 20 Praha 1. Grafická úprava Robin Brichta.
Technická redaktorka Brigita Dusiová. Odpovědná redaktorka Petra Královcová.
Vydání 1., 2016. Ediční číslo 11993. Sazba a tisk SERIFA®, s. r. o., Jinonická 80, 158 00 Praha 5.

http://av21.avcr.cz

ISBN 978-80-200-2631-6
9 788020 026316