

ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ MEKANİZMALARI ve YENİ İLAÇLAR

Prof. Dr. Nuri Kiraz

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

Tüberküloz, insanlık tarihi boyunca toplumların gündeminde kalmış, araştırmacıların ilgi odağı olmuş, başlıca sağlık problemlerinden birisidir. Tüberküloz ve lepra dışında hiçbir enfeksiyon hastalığının bu kadar eskiye dayandığına dair kanıt da yoktur. Robert Koch 1882’de tüberküloza neden olan basilin izolasyonunu sağlamıştır. Bunu 1921’de tüberküloz aşısı olan Bacillus Calmette Guérin (BCG)’nin Fransız araştırmacılar tarafından bulunuşu, 1944’de Waksman tarafından ilk tüberküloz ilacı olan streptomisin keşfi izler. Sonraları 1950’li yıllardan itibaren bulunan diğer tüberküloz ilaçları ile tüberküloz 18-24 ayda tedavi edilebilir hale gelmiştir. 1970’li yılların ortalarından itibaren tüberküloz tedavisi 6-9 aya indirilebilmiş ve günümüzde ise 6 aylık tedavi rejimlerine geçilebilmiştir. Son yıllarda sürdürülen çalışmalarda moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği yöntemleri mikobakteriyel enfeksiyonlarda yoğun şekilde araştırılmıştır.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki gruba ayrılır. Bunlardan primer ilaçlar; izoniazid (INH), rifampisin (RFM), pirazinamid (PZA), etambutol (ETM) ve streptomisin (SM) dir. Etambutol hariç diğerleri bakterisidal ilaçlardır. İkinci grub ilaçlar ise sikloserin, etiyonamid, kanamisin, kapreomisin ve paraaminosalisilik asit gibi daha toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır.

Tüberkülozun kontrolünde en çok korkulan konulardan birisi de ilaç direncidir. Bu gün dünyada en az 50 milyon multiple ilaç dirençli tüberküloz olgusu ile karşı karşıya kaldığımız bildirilmektedir. Bu durumdan sorumlu en önemli faktörlerin başında ise yetersiz ve/veya yanlış tedavi uygulamaları gelmektedir.

Antimikrobiyallere direnç primer veya sekonder olabilir. Primer direnç, daha önce antimikobakteriyel tedavi aldığı bilinmeyen hastalarda ortaya çıkar. Primer direnç için risk faktörlerinin; ilaca dirençli tüberkülozlu hastayla temas, dirençli olguların yüksek

olduğu toplumda yaşamak olduğu bildirilmiştir. Sekonder ilaç direnci , geçmişte tüberküloz tedavisi uygulanan hastalarda ortaya çıkan dirençdir.

Mycobacterium tuberculosis'de plazmidlere bağlı direnç tarif edilmemiştir. Daha ziyade tek basamaklı , rastgele , spontan kromozomal mutasyonlar sonucu oluşmakta ve bakteriler arası genetik aktarımı söz konusu değildir. İlaça duyarlı bakterilerin ölmesiyle varolan dirençli mutantlar belirgin hale gelir. Spontan direnç oranları sırasıyla INH, RFM, ETM ve SM için 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-6} ve 10^{-5} olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbirleriyle bağlantılı olmadıklarından , bakterinin iki ilaça birden spontan direnç geliştirmesi , olasılıkların çarpımına eşittir. Örneğin INH+RFM içi 10^{-14} dür. Diğer taraftan ilerlemiş kaveteli olgularda bile toplam bakteri sayısı ender olarak bu sayıya erişir. Tüberküloz tedavisinde multiple ilaçların kullanılması , direnç mutasyonlarına çok az sıklıkla rastlanması ve duyarlı bakterilere nakledilememesi temeline dayanır. Dolayısıyla birden fazla ilaç kullanılması dirençi önleyici en önemli faktörlerden birisidir.

Streptomisin

Streptomisin diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi protein yapımını inhibe ederek bakterilerde etki gösterirler. Bu etkisi bilhassa ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA üzerindendir. Diğer bakterilerde aminoglikozidlere direnç asetilasyon şeklinde ilaça inaktif edilmesi yoluyla olur. *M tuberculosis* de bu direnç şekline rastlanmıştır. *M tuberculosis* te streptomisine

direncin %80 ninde iki tür mutasyon saptanmıştır.

1. Ribozomal S12 proteinini kodlayan rpsL geninde nokta mutasyonu olmakta bu da tek amino asid değişimine neden olmaktadır. Aminoasid değişimi 88. kodonda lizinin arjinine , 43. kodonda ise lizinin arjinin veya treonine değişimi olarak gerçekleşmektedir.

2. Diğer mutasyon ise 16 S RNA yı kodlayan rrs geninde olmaktadır. Burada 530 kıvrımı ve 904 bölgesinde mutasyonlar olmaktadır. Muhtemelen ribozomlardaki bu değişiklik ilacın bakteriye bağlanmasını azaltmaktadır. Geri kalan %20 dirençli suşta üçüncü bir mekanizma söz konusu olabilir. Bazı dirençli suşlarda rpsL veya rrs'de mutasyon yoktur. Burada muhtemel mekanizma ilacın alınmasında bir engel oluşmasıdır. , buda hücre duvar geçirgenliğindeki değişikliğe bağlıdır. Sonuçta düşük veya orta derecede direnç oluşur. Diğer aminoglikozidlerle (kanamisin, amikasin) veya kapreomisin gibi siklik peptik protein ile çapraz direnç gözlenmemiştir.

Rifampisin

Streptomyces mediterranei 'nin kültür filtratlarından elde edilen rifampisinin sentetik bir derivativesidir. Rifampisin hidrofobik hücre zarından hızla diffüze olur. Bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazın potent inhibitörüdür. Rifampisin RNA polimerazı rpoB geni tarafından kodlanan b alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. Dirençli suşlarda mikobakteri RNA polimerazının beta alt ünitesini kodlayan geni rpoB de 27 amino asidlik bir bölgede anlamsız mutasyonlar saptanmıştır.

Rifampisin direnci isoniazid direnci ile birlikte sıklıkla görülmektedir. Direnç antibiyotikle karşılaşmamış suşların kültürlerinde yaklaşık 10^{-8} oranında görülmektedir. Mutasyonların büyük bir kısmının 526 ve 531 aminoasid pozisyonları arasında olduğu kabul edilmektedir. Bu mutasyonlar çeşitli coğrafik bölgelerden elde edilen izolatlarda bulunmuş fakat direncin derecesi ile ilişkisi bulunamamıştır. Ayrıca çoklu dirençli fenotipler ile ilişkili bulunmamıştır. Bilhassa daha önceden tüberküloz tedavisi görmemiş kişilerde . Yeni sentetik deriveler olan rifabutin ve rifapentin rifampisinden daha etili değildirler. Çapraz direnç de aralarında söz konusu değildir.

İsoniazid ve ethioamid

INH (isonikotinic asid hidrazid) ve etionamid benzer yapıdadırlar. Her iki ilaçta benzer aktivasyon mekanizmalarına sahiptirler, mikolik asit yapımını bozarlar Mikobakteri hücre duvarının dış zarfında bulunan mikolik asitlerin varlığı hidrofilitik solütlere etkili bir permeabilite engeldir.

İlk çalışmalar INH'a dirençli basiller ile katalaz-peroksidaz aktivitesi arasında ilişkiyi göstermişlerdir. INH'a dirençli klinik izolatların yaklaşık %50 sinde katalaz-peroksidazı kodlayan katG geninde delesyonlar ve anlamsız mutasyonlar saptanmıştır. INH mikobakteriyel katalaz-peroksidaz ile reaksiyon sonucu aktive edilmesi gereken bir öncü ilaçtır. Katalaz-peroksidazdaki mutasyonlar sonucu inaktif enzim ortaya çıkar ve bu enzim ön ilacı aktive etmez ve yüksek derecede INH direncine yol açar. Bu mekanizma klinik izolatlarda en çok rastlanan direnç mekanizmasıdır.,

M tuberculosis de aktive olan INH inhA geni tarafından kodlanan enoil redüktaz enzimine bağlanır ve redüktaz aktivitesi inhibe olur. Enoil redüktazda mikolik asit sentezinde rol oynayan bir enzimdir. Bu nedenle inhA bölgesindeki mutasyonlarda INH'a dirençte rol oynarlar. Klinik izolatların yaklaşık %25 inde inhA geninde mutasyonlar saptanmıştır.

KatG katalaz- peroksidaz aktivitesini ortadan kaldıran mutasyonlar INH aktivasyonunu engellemekte ve bu ilaca dirençte majör mekanizma olarak görülmektedir. Fakat kat G aktivitesinin kaybolması

bir paradoks olarak görülmektedir. Çünkü kat G aktivitesi organizmanın yaşayabilmesi için önemli bir faktördür. *M tuberculosis* de alkil hidroperoksidaz redüktazı kodlayan ahpC geni bulunmuştur. INH'ın aktif ara ürününü detoksifiye ettiği düşünülmektedir. KatG'nin veya alkilhidroperoksidaz ahpC nin ekspresyonu basili organik peroksidlerin toksik etkilerine karşı korumaya yeterlidir. Enfeksiyon süresinde yaşayabilmek için INH'a dirençli katG mutanlarının kat G katalaz-peroksidaz kayıplarını ikinci bir mutasyonla ahpC nin fazla yapımı ile kompanse ettiği düşünülmektedir.

Etionamid INH'ınan potent yapısal analogudur. Etionmidin etki mekanizması INH'a benzer. Ön ilaç olarak aktivasyon ihtiyacı vardır. Enoil redüktazdaki mutasyonlar etionamide direnç oluştururken , katalaz-peroksidaz geninde mutasyon içeren INH'e dirençli suşlar etionamide duyarlı kalır. Bu durumda etionamidi aktive eden başka bir enzim olmalıdır ki bu enzim bu ön ilacı inhA kodlu enoil redüktaz a bağlanabilir forma getirmektedir ve sonuçta bu enzimi inhibe

etmektedir. Bir diğer mekanizma enoil redüktazın fazla ekspresyonuna bağlı olarak gelişen dirençtir. INH a dirençli klinik izolatların çoğu inhA geninin promotor bölgesinde mutasyonlar içerir ve enoil redüktaz yapımı artar, Sonuçta ilaç enzimin bir kısmını inhibe edebilmekte , fazla miktardaki enzim mikolik asit yapımına devam etmektedir.

Etambutol

İlaçın hedefi bakteri dış duvarıdır. İlaç verildikten 15 dakika sonra mikolik asitlerin hücre duvarına transferi inhibe edilir. Mikolik asitler hücre duvarındaki arabinogalakton polimerinin terminal D arabinoz artıklarının 5' hidroksil gruplarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Etambutolün etkisi aktif mikolik gruplarının arabinogalaktona taşınmasını engellemek veya arabinogalakton sentez aşamalarında inhibisyon yapmaktır. Son zamanlarda etambutolün hedefinin arabinozil transferaz veya arabinoz akseptörü sentezi ile ilgili herhangi bir enzim olabileceği de düşünülmüştür.

Bir gen bölgesi EmbCAB operonu idendifiye edilmiştir. Arabinozil transferazı kodlamaktadır. Etambutole direnç emb proteinlerinin fazla yapımı ve embB de mutasyonlar sonucu gelişmektedir. embCAB lokusu ile yapılan çalışmada etambutole dirençli suşların %89 da embB de 306 aa rezidüsünde değişiklikler saptanmıştır. Bu da embB deki değişiklikler sonucu ilaç protein etkileşiminin değiştiği ve sonuçta EMB direncinin geliştiği görüşü destek kazanmaktadır.

Pirazinamid

İlaç in vivo olarak sterilizan etkisini asidik hücre içi bölümlerde gösterir. Makrofaj fagolizozomlarındaki semidorman *M. tuberculosis*'e göstermektedir. Mikobakterilerin pirazinamide duyarlılığı spesifik amidazin varlığına bağlıdır. Bu amidaz pirazinamid ve nikotinamidi hidrolize eder. Bu nedenlerden dolayı pirazinamidde INH gibi bir öncü ilaçtır. Mikobakteri hücre duvarından diffüze olur. Ve pirazonoik aside çevrilirki bu ilağın aktif formudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda pirazonoik asit esterlerinin in vitro şartlarda *M. tuberculosis*'e pirazinamidden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Dirençli suşlarda pirazinamidaz aktivitesinde kayıp belirlenmiştir. Dirençli suşların %72-94'ünde bu enzimi kodlayan PncA gen bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır.

Florokinolonlar

Bu ilaçların hedefi DNA giraz enzimidir. Enzim 2A ve 2B alt ünitelerinden oluşmuş bir heterotetramerdir. Bunlar gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanır. Florokinolonlar DNA giraza bağlanarak bakteri DNA'sının süpersarmal oluşumunu engellerler. Dirençli suşlarda gyrA ve gyrB genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Yüksek düzeyde siprofloksasin direnci gyrA geninin 90.kodonu civarındaki anlamsız mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur. Kinolon bağlanma bölgesindeki spesifik mutasyonların akümüasyonu MIC değerlerindedir kümülatif etki yapmaktadır, dolayısıyla tedavi altındaki hastalarda direnç gelişme tehlikesi bulunmaktadır. İkinci bir direnç şekli düşük seviyede dirençdir. Burada

normal DNA giraz genleri vardır. Fakat mekanizma henüz aydınlatılamamıştır.

Yeni antitüberküloz ilaç araştırmaları

Yeni antitüberküloz ilaç arayışları başlıca üç nedeni bulunmaktadır. Bunlar; Mevcut tedavi süresini daha da kısaltabilmek, MDR tüberkülozlu olgularda başarı sağlamak ve latent tüberkülozlu olguların tedavisinde daha etkin tedavi sağlamaktır. Ticari firmaların yeni antitüberküloz ilaç geliştirmek için yeterli ilgi gösterdikleri söylenemez. Üzerinde en çok çalışılan yeni ilaçlar rifamisinler, yeni florokinolonlar, Oksazolidinonlar ve nitroimidazopiranlar'dır. Bir rifamisin türevi olan rifabutin, HIV pozitif tüberkülozlu hastalarda antiretroviral ilaçlarla etkileşiminden dolayı rifampin alamayan hastalarda önerilmektedir. Florokinolonların iki yeni üyesi olan moxifloksasin ve gatifloksasin ilaç duyarlı tüberküloz olgularında başarı ile kullanıldığı bildirilmiştir. Oksazolidinonların öncü üyesi olan linezolid tüberküloz olgularının tedavisinde ümit bağlanan ilaçlardan birisidir. Nitroimidazopiran bileşiği olan PA-824 maddesi replike olmayan organizmler üzerine etkili bulunduğu tüberküloz tedavisinin kısaltmasında yararlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agent Chemother 1999; 43:199-212.
2. Giellespie SH. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. Antimicrob Agent Chemother 2002; 46:267-74.
3. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:496-514.
4. Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW, Salfinger M. Drug resistance in tuberculosis. Infect Dis Clin North Am 1997; 11:905-28.
5. O'brein RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2001; 162:1055-8.
6. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis:1998 update. Tubercle and Lung Disease 1998; 79:3-29.
7. Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4:S4-S10.
8. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampine, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respir Res 2001; 2:164-8.
9. Tuberculosis Drug Screening program. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. Antimicrob Agent Chemother 2001; 45: 1943-6.
10. Viedma DG. Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Ingect 2003;9:349-59.
11. Zhang Y, Young D. Molecular genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis J Antimicrob Chemother 1994; 34:313-9.