

Protuupalno djelovanje antibiotika

*Alemka MARKOTIĆ, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog
Lidija CVETKO KRAJINOVIĆ, dipl. ing.
mol. biol., znanstveni novak*

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran
Mihaljević", Zagreb

Ključne riječi

*antibiotici
upala
imunomodulacija
multipleks laboratorijska tehnologija*

Key words

*antibiotics
inflammation
immunomodulation
multiplex laboratory technology*

Primljeno: 2011-03-16

Received: 2011-03-16

Prihvaćeno: 2011-03-23

Accepted: 2011-03-23

Pregledni članak

Kad je Alexander Fleming otkrio prvi antibiotik, penicilin, ne samo da nije znao kako izolirati čisti penicilin, nego nije ni slutio koliko će to otkriće promijeniti svijet i medicinu u budućnosti, osobito kako će utjecati na razvoj infektologije. Analizirajući mehanizme djelovanja antibiotika, gotovo smo potpuno usredotočeni samo na njihovo direktno djelovanje na ciljni mikroorganizam. Većinom gotovo potpuno zanemarujemo druge potencijalne učinke, kao što je npr. njihovo imunomodulatorno djelovanje, koje može imati ne samo učinak u borbi protiv određene bakterije, nego potencijalno može dovesti do novih smjernica u liječenju infektivnih bolesti izazvanih drugim uzročnicima, ali moguće i nekih imunoloških poremećaja. U ovom radu kratko ćemo se osvrnuti na samo jedan, ali važan oblik imunomodulacije, protuupalni učinak antibiotika. U radu se donosi pregled do sada poznatih protuupalnih svojstava tri skupine antibiotika koje su u dosadašnjim istraživanjima pokazale najsnažnije protuupalno djelovanje: makrolidi, kinoloni i tetraciklini. Imunomodulacija uzrokovana antibioticima predstavlja još uvijek neotkriveno i uzbudljivo područje medicine, kako za znanstvenike, tako i za kliničare praktičare, a osobito za farmaceutske industrije. Značajan preduvjet za razvoj ove discipline i novih spoznaja predstavljaju moderne multipleks laboratorijske tehnologije koje nam mogu pomoći da sagledamo i barem dijelom shvatimo svu kompleksnost imunoreakcija odgovornih u složenim procesima imunomodulacije. U ovom radu dali smo i sažet prikaz multipleks laboratorijskih metoda koje se koriste u bazičnim istraživanjima imunomodulatornih svojstava antibiotika, ali i koje bi mogle naći svoju primjenu u određivanju imunomodulacijskog učinka antibiotika u liječenju infektivnih bolesti praćenjem određenih imunoloških parametara, ali i moguće u nekim autouupalnim sindromima.

Anti-inflammatory effect of antibiotics

Review article

When Alexander Fleming discovered the first antibiotic, penicillin, he did not know how to isolate pure penicillin, nor could he have imagined how this discovery would change the world and medicine one day, particularly how it would affect the development of infectious diseases. When analyzing the mechanism of action of antibiotics, we are almost totally focused on their direct effect on the target microorganism. We tend to completely ignore their other potential effects, such as immunomodulation, which may not only have impact in the fight against certain bacteria, but can potentially lead to new guidelines for treating infectious diseases caused by other pathogens, and possibly some immunological disorders. In this paper we will briefly describe one important form of immunomodulation, anti-inflammatory effect of antibiotics. The paper provides an overview of known anti-inflammatory features of three groups of antibiotics that so far showed the strongest anti-inflammatory effect: macrolides, quinolones and tetracyclines. Immunomodulation caused by antibiotics is still an undiscovered and exciting area of medicine, both for scientists and clinicians and especially for the pharmaceutical industry. An important prerequisite for the development of this discipline are modern multiplex laboratory technologies that can help us realize and understand at least part of the complexity of immune reactions responsible in the complex process of immunomodulation. In this paper, we present a summary of multiplex laboratory technologies used in basic research of immunomodulatory properties of antibiotics, that could find their application in determining immunomodulatory effect of antibiotics in the treatment of infectious diseases by monitoring specific immune parameters, and possibly in some autoinflammatory syndromes.

Uvod

Kad je Alexander Fleming otkrio prvi antibiotik, penicilin, ne samo da nije znao kako izolirati čisti penicilin, nego nije ni slutio koliko će to otkriće promijeniti svijet i medicinu u budućnosti, osobito kako će utjecati na razvoj infektologije. Prava antibiotska era počinje pred Drugi svjetski rat kada Florey i Chain uspijevaju izolirati čisti penicilin, a nakon toga se sljedećih četrdesetak godina nižu uspjesi u otkrivanju i sintezi novih antibiotika ili bolje rečeno antimikrobnih lijekova [1]. Antibiotike dijelimo prema spektru njihovog djelovanja, učinku, kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja. Analizirajući mehanizme djelovanja antibiotika, gotovo smo potpuno usredotočeni samo na njihovo direktno djelovanje na ciljni mikroorganizam [2]. Većinom gotovo potpuno zanemarujemo druge potencijalne učinke, kao što je npr. njihovo imunomodulatorno djelovanje, koje može imati ne samo učinak u borbi protiv određene bakterije, nego potencijalno može dovesti do novih smjernica u liječenju infektivnih bolesti izazvanih drugim uzročnicima, ali moguće i nekih imunoloških poremećaja. Koliko malo znamo o ovom još nedovoljno istraženom području shvatit ćemo kratkim pregledom PubMed baze kada vidimo da broj radova dobivenih pri pretraživanju s ključnim riječima "antibiotici i imunomodulacija" [3] iznosi 1 % od ukupnih radova pretraženih pod ključnom riječi "antibiotici" [4]. U ovom radu kratko ćemo se osvrnuti na samo jedan, ali važan oblik imunomodulacije, protuupalni učinak antibiotika, te na domet moderne laboratorijske tehnologije koja nam može pomoći u boljem istraživanju imunomodulatornog djelovanja antibiotika i promišljanju kako bismo učinkovitost antibiotske terapije u bolesnika s infektivnim bolestima mogli u budućnosti određivati i mjerenjem određenih imunoloških parametara.

Upala

Upalni procesi prate sve infekcije i značajan su čimbenik imunopatogenetskih mehanizama različitih akutnih i kroničnih infektivnih bolesti.

Akutna upala

Upalu karakteriziraju njezinini makroskopski glavni simptomi: crvenilo (*rubor*), toplina (*calor*), bol (*dolor*), oteklina (*tumor*) i smetnje u funkciji (*functio laesia*), a sastoji se od slijeda dinamičnih procesa, vaskularnih, neuroloških, humoralnih i celularnih, koji se zbivaju lokalno, na mjestu oštećenja tkiva, a nastaju gotovo pri svakoj imunoreakciji [5–8]. Nakon oštećenja tkiva, na staničnoj razini, mastociti i bazofili (nalaze se u gotovo svim tkivima) se aktiviraju i luče medijatore upale među kojima su najpotentniji histamin i leukotrijeni. Oni djeluju na lokalnu mikrovaskulaturu i induciraju permeabilnost. Kontrakcija

endotela mikrovaskulature rezultira stvaranjem otvora kroz koje plazma izlazi u tkiva (edem). Napuštanjem svog prirodnog okružja plazma i faktori zgrušavanja dolaze u kontakt s tkivima i kemikalijama koje ih aktiviraju. Kao rezultat toga dolazi do aktivacije kininskog sustava i oslobađanja kinina. Ukoliko dođe do prolaska štetnih agensa kroz oštećenu barijeru, dolazi i do aktivacije komplemenata. Stimulacija vaskularnih endotelih stanica uzrokuje ekspresiju staničnih adhezijskih molekula koje vežu cirkulirajuće fagocite i limfocite, što inducira nakupljanje stanica na mjestu oštećenja (marginacija). Stimulirana je ekstravazacija i kemoatrakcija ekstravaziranih stanica. Nakupljene stanice napuštaju vaskulaturu i migriraju u okolno tkivo. Nakon toga slijedi aktivacija fagocitne i sekretorne funkcije nakupljenih stanica. Osim citokina i kemokina koji se luče kao posljedica aktivacije stanica, oslobađaju se dodatne količine histamina i leukotrijena, te brojni enzimi. Zadnja faza upalne reakcije je cijeljenje koje započinje djelovanjem produkata makrofaga [5–9].

Kronična upala

Kronična upala može biti nastavak akutne upale ili rezultat kontinuiranog odgovora na strano tijelo ili perzistenciju mikroorganizma. Značajke kronične infekcije su: unutar 24–48 h uključuje infiltraciju molekularnih upalnih stanica (makrofagi, plazma stanice, limfociti, ponekad eozinofili). Može uključivati i proliferaciju fibroblasta i malih krvnih žila (angiogeneza). Često rezultira fibrozom, a može dovesti do oštećenja tkiva i gubitka funkcije.

Makrofagi putuju na mjesto upale unutar 24–48 h i aktivirani su IFN- γ , bakterijskim endotoksinom, te proteini-ma ekstracelularnog matriksa. Oni mogu utjecati na regrutaciju ostalih stanica, te živjeti kroz nekoliko mjeseci. Oni također reguliraju limfocitni odgovor na antigen, te luče ostale medijatore koji reguliraju širenje i funkciju fibroblasta i endotelih stanica. Limfociti su aktivni i u humoralnim i u stanicama posredovanim imunoreakcijama. Limfociti T reguliraju aktivaciju makrofaga, te njihovu regrutaciju preko lučenja specifičnih medijatora. Također reguliraju produkciju antitijela i citotoksične T-limfocite. Plazma stanice su izvor antitijela, koja su važna za neutralizaciju antigena, odstranjivanje stranih čestica i za o antitijelima ovisnu staničnu citotoksičnost. Pri granulomatoznoj upali aktivirani su makrofagi (epiteloidne stanice) i limfociti. Nodularne nakupine epiteloidnih stanica stvaraju granulome, koji predstavljaju osnovnu značajku granulomatozne upale. Ove formacije nastaju kao odgovor na materijal ili mikroorganizme koji se ne može fagocitirati. Dva tipa velikih stanica koje su vidljive pri granulomatoznoj upali su rezultati fuzije aktiviranih makrofaga: Langerhansove gigantske stanice u kojih su jezgre raspoređene na periferiji kao potkovice, te gigantske stanice stranog tijela, u kojih su jezgre u centru. Oko mjesta upale nalazimo brojne limfoblaste. Zadnji stadij pri odgovoru na

strano tijelo i cijeljenje je razvoj fibroze. Proces reparacije uključuje dva različita procesa: zamjenu tkiva parenhimskim stanicama istog tipa ili zamjenu vezivnim tkivom. Kao odgovor na upalni poticaj može doći do smanjenja mase tkiva, te stvaranje novog tkiva kroz granulacije; sinteze kolagena i drugih molekula; stvaranja ožiljka. Proces ovakvog preoblikovanja je različit za različita tkiva [7–11].

Antibiotici, infekcija i upala

Obzirom da je visoki postotak infekcija bakterijske etiologije, koje u pravilu liječimo antibioticima, pored antimikrobnog djelovanja, bilo bi razumno znati nešto i o potencijalnim protuupalnim učincima antibiotika tijekom liječenja bakterijskih infekcija. Takve spoznaje mogle bi rezultirati dodatnim algoritmima liječenja koji će uvažavati i pozitivne imunomodulatorne, protuupalne učinke antibiotika, a ne samo vrijeme potrebno za uništenje mikroorganizama. Nadalje, spoznaje o protuupalnim učincima različitih antibiotika mogle bi imati utjecaj i na odabir antibiotika ili kombinacije antibiotika s ciljem "smirivanja" upale, a ne samo uništenja mikroorganizama, a moguće i modulacije ishoda bolesti, uključujući i razvoj kronične infekcije, te njezine rezolucije. U radu se donosi pregled do sada poznatih protuupalnih svojstava tri skupine antibiotika koje su u dosadašnjim istraživanjima pokazale najsnažnije protuupalno djelovanje: makrolidi, kinoloni i tetraciklini.

Makrolidi

Iako je još uvijek ograničen broj studija na ovu temu, postoje podaci koji potvrđuju da mnogi makrolidni antibiotici mogu imati učinka u modulaciji upale: djelovanje na kemotaksiju upalnih stanica, sintezu citokina, ekspresiju adhezijskih molekula i produkciju reaktivnih metabolita kisika i dušikovog oksida (NO) [12–16]. Makrolidi su sposobni akumulirati se u neutrofilima i makrofazima po znatno višim koncentracijama nego u izvanstaničnoj tekućini.

Makrolidi inhibiraju proizvodnju proupalnih citokina kao što su interleukin (IL) -1, IL-6, IL-8, i čimbenik nekroze tumora-alfa (TNF- α), vjerojatno djelujući na transkripcijski nuklearni faktor kappa B (NF- κ B) ili aktivator protein-1 (AP-1). NF- κ B je protein koji je ključan za transkripciju gena koji kodiraju brojne proupalne molekule koje sudjeluju u akutnim upalnim reakcijama, uključujući TNF- α , međustaničnu adhezijsku molekulu (ICAM-1), inducibilnu sintetazu dušikova monoksida (iNOS), IL-6 i IL-8 [17, 18]. Poznato je da u okviru imunoreakcija koje nastaju kao odgovor na lipopolisaharid (LPS), TNF- α , i agregirane imunokomplekse dolazi do ekspresije kemokina IL-8. Dokazano je da makrolidni antibiotici inhibiraju

ekspresiju gena za iNOS i NO potaknute oslobađanjem imunokompleksa. Makrolidi također inhibiraju nakupljanje neutrofila u plućnim alveolama, što može objasniti njihov inhibitory učinak na ekspresiju ICAM-1 i oslobađanje kemoatraktanta za neutrofile, kao što je IL-8. Važan oblik upale je kao što smo već spomenuli i ekstravazacija neutrofila u tkiva. Makrolidi blokiraju formiranje i ekspresiju adhezijskih molekula (npr. ICAM-1) potrebnih za migraciju neutrofila. Makrolidi također inhibiraju formiranje leukotrijena B₄, koji privlače neutrofile. Zajedno, ovi protuupalni učinci rezultiraju poboljšanjem funkcije pluća i dišnih putova. Razne stanice, uključujući neutrofile, limfocite T i epitelne stanice, luče IL-8, što zauzvrat potiče regrutaciju i aktivaciju neutrofila. Neutrofilni su kao što znamo i primarni izvor, a i primarni stanični cilj za IL-8 [13–19]. Za testiranje hipoteze da makrolidi moduliraju upalu inhibicijom NF- κ B aktivacije, Ichijama i suradnici [20] su analizirali djelovanje pretretmana klaritromicinom na nekoliko staničnih linija (monocitne, T-stanične linije i plućne epitelne stanice), te na mononuklearne stanice periferne krvi. Pokazali su da klaritromicin inhibira NF- κ B aktivaciju vrlo vjerojatno na razini gena za proinflatorne citokine, a u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji lijeka. Aoki i Kao, [21] su pokazali da eritromicin inhibira NF- κ B aktivaciju stimuliranih Jurkat stanica (limfociti T). Dokazana je inhibicija IL-8, ali ne i IL-2, na transkripcijskoj razini. Sposobnost inhibicije aktivacije NF- κ B i posljedične produkcije IL-8 i IL-6 zabilježena je i za azitromicin [12–14]. Protuupalni učinak makrolida može vjerojatno ovisiti i o vrsti stanica na koje djeluju. Tako suprotno prethodnim opažanjima, koja se vezuju za epitelne stanice respiratornog sustava, te monocite i limfocite T, ispitivanja na humanim fibroblastima porijeklom iz gingiva pokazuju povišenu produkciju IL-8 pod djelovanjem azitromicina, dok eritromicin nije imao učinka na razinu IL-8 i IL-6. U istoj studiji je pokazano da makrolidi nisu imali učinka na produkciju metaloproteinaza [22]. Mehanizmi protuupalnih djelovanja makrolida su očito multifaktorijski i zahtijevat će još brojne studije fokusirane ne samo na njihovo protuupalno djelovanje u infektivnim bolestima, nego i u drugim upalnim procesima kao što su reumatski, autoupalni, autoimuni i dr.

Kinoloni

Slično kao i kod makrolida i kod kinolona ne nalazimo veliki broj studija o njihovom imunomodulatornom djelovanju. Podaci o njihovom protuupalnom djelovanju ovise također o pokusnim modelima, u prvom redu o stanicama koje su korištene u istraživanjima, te zbog toga imamo dijelom i različite, pa koji put i kontradiktorne rezultate. Osim toga, stanovite razlike također mogu postojati i između vrste primijenjenog kinolona. Najveći broj istraživanja se u zadnje vrijeme provodi s moksifloksacinom,

nešto manje s ciprofloksacinom. Jedna od studija je analizirala imunomodulatorno djelovanje moksifloksacina na oslobađanje proupalnih citokina iz ljudskih monocita aktiviranih lipopolisaharidom (LPS). Zabilježena je inhibicija upalnih medijatora koji se oslobađaju u sklopu tri signalna puta važna u procesu upale: NF- κ B, mitogenom-aktivirana protein kinaza ERK i c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) [23, 24]. Slični rezultati su dobiveni u jednom drugom istraživanju u kojem su korištene klinički relevantne doze moksifloksacina (2,5–10 mg/L) na epitelnim linskim stanicama pluća (A549), gdje su moksifloksacin, te ciprofloksacin u višim dozama pokazali isto djelovanje i u stanicama bronhalne stanične linije [25]. Nedavno je zapažena i uloga kinolona u regulaciji apoptoze neutrofila. Jedan od homeostatskih mehanizama na mjestu upale je proces konstitutivne apoptoze, kojim se na mjestu infekcije kontrolira razina upalnog procesa. Zapaženo je da su različiti kinoloni različito modulirali ove procese. Dok je to-sufloksacin odgađao smrt neutrofila općenito, pa tako i apoptozu, ofloksacin, lomefloksacin, fleroksacin, sparfloksacin i levofloksacin su značajno promovirali smrt neutrofila, bez učinka na konstitutivnu apoptozu neutrofila. Izgleda da to-sufloksacin svoje djelovanje provodi preko aktivacije inhibitora fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) i p38 mitogenom-aktivirane proteinkinaze (MAPK) [26].

Tetraciklini

Tetraciklini su također potentni imunomodulatori [27–34], a najvažnije imunomodulatorno svojstvo tetraciklina je svakako njihov inhibitory učinak na metaloproteinaze. Doksiciklin je jedini poznat sintetski inhibitor matriks metaloproteinaze (MMP) [35]. Smatra se da su MMP odgovorne za promet i razgradnju izvanstaničnog matriksa. Međutim, to nije ni jedina ni glavna funkcija ovih proteinaza. Nedavna otkrića pokazuju da MMP djeluju na proupalne citokine, kemokine i druge proteine regulirajući različite aspekte upale i imunoreakcija. Kolagen, želatina, elastin, fibronektin, proteoglikan i vitronektin su važni proteini koji formiraju "mrežu", ekstracelularni matriks, koja drži stanice višestaničnog organizma zajedno. MMP su dio obitelji o cinku-ovisnih endopeptidaza koje degradiraju ekstracelularni matriks i imaju važnu ulogu u njegovom remodeliranju. To remodeliranje je važno kako u fiziološkim, tako i u patološkim procesima kao što su trudnoća, cijeljenje rana, karcinomi i artritis, a sve je više radova i o njihovoj ulozi u infektivnim bolestima. MMP mogu pojačati invaziju leukocita i regulirati upalne aktivnosti posredovne serin-proteazama, citokinima i kemokinima [36–39]. Ono što MMP čini zanimljivima i intrigantnima je njihova "dvojna osobnost". Tako npr. metaloproteinaze kao što su MMP-2 i -9 mogu sudjelovati i posredovati i u pro- i protuupalnim imunoreakcijama. Zbog velikog kliničkog značaja, MMP su već dugo važne ciljane molekule za farmaceutsku industriju.

Iako su brojni lijekovi kandidati ispitivani kao inhibitori MMP, samo jedan agent (doksiciklin hyclate) je trenutno odobren za kliničku uporabu [40]. Prema nekim studijama tetraciklini bi mogli utjecati inhibitory na proupalnu kaskadu koja započinje nakon aktivacije kaspaze-1, što posljedično dovodi do proizvodnje proupalnih citokina kao što su IL-1 i IL-18. Kao protuupalni lijekovi tetraciklini su u *in vivo* pokusu na miševima pokazali protuupalnu učinkovitost u dijabetesu. Nakon dva mjeseca od indukcije dijabetesa, minociklin je spriječio pojavu hiperglikemije inducirane aktivacijom kaspaze-1 i posljedične proizvodnje IL-1 β u mrežnici. Dugotrajna primjena minociklina pokazala se uspješnom u sprječavanju retinalne degeneracije kapilara u miševa s induciranim dijabetesom [41, 42]. Mehanizmi protuupalnog djelovanja tetraciklina ni izdaleka još nisu jasni ni poznati. Jedno od značajnih protuupalnih svojstava tetraciklina bila bi njihova sposobnost da pojačaju produkciju IL-10 u stanicama sisavaca [43]. Važna uloga ovog citokina je u kontroli sistemskog upalnog procesa. Važni učinci IL-10 su: inhibicija proizvodnje proupalnih citokina i kemokina induciranih endotoksinima, te indirektno aktivacije endotelnih stanica i adhezije; inhibicija ekspresije monocitnog tkivnog faktora važnog za prokoagulantne aktivnosti i u diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji krvi; inhibicija ekspresije glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) II, ICAM-1 i kostimulacijskih molekula, CD80 i CD86; povišenje ekspresije FcR na monocitima, uključujući CD16 i CD64 važnih u procesu fagocitoze; snižavanje IL-4 inducirane ekspresije CD23 molekula [44–48]. U SAD-u je patentom zaštićena metoda koja koristi sastojke tetraciklina u pojačanoj produkciji IL-10 u stanicama sisavaca. U ovom postupku su se odstranjivale ili smanjivale komponente tetraciklina koje imaju antimikrobno svojstvo, a metoda je predviđena za liječenje sisavaca s upalnim stanjima s prekomjernom produkcijom IL-1 i TNF- α [49].

Moderne multipleks laboratorijske tehnologije u detekciji imunoreakcija u procesu imunomodulacije

Multipleks tehnologija je pojam koji opisuje laboratorijske tehnike ili metode pomoću kojih se istovremeno može mjeriti, odnosno analizirati veći broj (od nekoliko desetaka pa čak do milion) analita unutar jednog esejja. Upravo kako bi se zadovoljili teški zahtjevi za postizanjem ovako visokog stupnja usporednosti, ove metode često u svojoj realizaciji zahtjevaju ili specijalnu tehnologiju ili se ide na minijaturizaciju samog esejja. Danas, široku primjenu multipleks esejja nalazimo u istraživanjima na području funkcionalne genomike gdje se, pojednostavljeno rečeno, nastoji detektirati ili ispitati stanje svih biomolekula određene vrste (npr. glasnička ribonuk-

leinske kiseline – RNK, proteini) unutar biološkog uzorka kako bi se odredio utjecaj nekog eksperimentalnog tretmana ili utjecaj pojedine mutacije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) na sve biomolekule ili signalne putove u ispitivanom uzorku. Multipleks tehnike možemo ugrubo podijeliti na one koje se baziraju na detekciji nukleinskih kiseline, one koje se baziraju na detekciji proteina, te ostale multipleks tehnike. U daljnjem tekstu spomenut ćemo neke značajnije multipleks metode koje se koriste u različitim istraživanjima imunomodulatornih svojstava antibiotika, ali i koje bi mogle naći svoju primjenu u određivanju imunomodulacijskog učinka antibiotika u liječenju infektivnih bolesti praćenjem određenih imunoloških parametara, ali i moguće u nekim autoupalnim stanjima [50].

1. Multipleks tehnike koje se baziraju na nukleinskim kiselinama

Tehnologija DNK-nizova/čipova – Metoda koja u osnovi ima multipleks tehnologiju, a koja je dramatično ubrzala mnoge vrste istraživanja je svakako metoda DNK-nizova ili čipova (od engl. DNA microarray ili DNA chip). DNK-čip je matrica koja se sastoji od mnoštva mikroskopskih polja koja su ispunjena kratkim oligonukleotidnim slijedovima DNK. Svako pojedinačno polje sadrži specifične DNK-sekvence koje nazivamo probe ili reporteri (od engl. probes ili reporters). Najčešće su te sekvence kratki dijelovi određenih gena ili neki drugi elementi DNK koji se koriste za hibridizaciju pod vrlo strogim uvjetima sa željenim uzorkom [komplementarna - DNK (od engl. Complementary DNA -cDNK) ili RNK]. Prethodno obilježeni uzorak (fluoroforom, srebrom ili kemiluminiscentno) omogućuje detekciju i kvantifikaciju hibridizacije između probe i ciljne sekvence te indirektno određivanje relativne količine ciljne nukleinske kiseline u ispitivanom uzorku. Metoda DNK-čipova koristi se za detekciju nukleinskih kiseline, DNK ili RNK (najčešće kao cDNK), koje mogu, a i ne moraju biti prevedene u proteine [51]. Primjenu ovih čipova najčešće nalazimo u tzv. istraživanjima analize genske ekspresije (od engl. gene expression analysis/profiling). Praćenjem razine ekspresije i do nekoliko tisuća gena mogu se identificirati geni čija je ekspresija promijenjena, a kao odgovor na određenu terapiju, bolest ili specifični patogen [52]. Jedna među mnogim primjenama je i detekcija SNP-ova (od engl. single nucleotide polymorphisms) unutar jedne ili među različitim populacijama. Osim što ovakve vrste analiza imaju svoju primjenu u forenzici, također su pronašle svoju primjenu i u određivanju predispozicije za određene bolesti, identifikaciji lijekova kandidata te mnogim drugim [53].

Multipleks PCR – Ova metoda je modifikacija metode lančane reakcije polimerazom (od engl. polymerase chain reaction – PCR). Ono što je inovativno u metodi je da se unutar jedne PCR-reakcije koriste višestruki setovi početnica (od engl. primers) za amplifikaciju genomske

DNK što u konačnici rezultira dobivanjem amplikona različitih veličina specifičnih za različite DNK-sekvence [54]. Ovom metodom također možemo pratiti razinu genske ekspresije, ali je za razliku od tehnologije DNK-čipova ograničena na praćenje manjeg broja gena (do nekoliko desetaka istovremeno). Danas na tržištu postoje različiti i brojni paneli za detekciju gena odgovornih u različitim tipovima imunoreakcija, signalnim putevima ili gena čiji produkti sačinjavaju pojedine grupe molekula važne u određenim imunoreakcijama.

2. Multipleks tehnike koje se baziraju na proteinima

Tehnologija proteinskih nizova/čipova – Tehnologija proteinskih nizova (od engl. protein array) brzo je postala moćno sredstvo za detekciju proteina, praćenje razine njihove ekspresije, te istraživanje njihove interakcije i funkcije. U kratkom vremenu ova tehnologija potaknula je snažan napredak i interes među znanstvenicima i stručnjacima, a među proizvođačima dovela do prestižne utrke za proizvodnjom što bolje, pouzdanije i učinkovitije metodologije, ali i razvoja atraktivnih panela proteina za detekciju i izučavanje, primjerenih određenim bolestima, kliničkim sindromima i stanjima. Ova tehnologija omogućila je paralelnu multipleks analizu tisuća interakcija: protein-antitijelo, protein-protein, protein-ligand, protein-lijek, enzim-supstrat kao i razvoj brojnih multianalitičkih i dijagnostičkih testova. Bez obzira bazira li se na mikronizovima ili čipovima, ova tehnologija uz razvoj posebnih kompjutorskih softvera omogućava generiranje i analizu brojnih interakcija i parametara značajnih u odvijanju različitih imunoreakcija, pa tako i imunomodulatornih mehanizama potaknutih različitim lijekovima uz minimalnu upotrebu materijala, i generiranje velike količine podataka [55].

Danas postoje tri glavne vrste tehnologija proteinskih nizova: 1. proteinski nizovi velikih razmjera s funkcionalnim čipovima koji se koriste za detekciju širokog spektra funkcija (interakcije protein-protein, protein-DNK, aktivnost enzima), otkrivanje antitijela i određivanje njihove specifičnosti [56]; 2. analitički hvatajući (od engl. capture) nizovi za otkrivanje i kvantifikaciju analita u kompleksnim smjesama, kao što su plazma/serum ili ekstrakti tkiva [57, 58]; 3. reverzni proteinski nizovi specifični za tkivne lizate otisnute na površini, u kojima se ciljne molekule detektiraju specifičnim antitijelima [59].

Za tehnologiju proteinskih nizova danas se već može reći da predstavlja središnju tehnologiju u proteomici, kako u temeljnim istraživanjima, tako i u području translacijske medicine, ali i snažnu tehnologiju za komercijalni razvoj biotehnoloških kompanija. Dobro je poznato da je složenost ljudskog proteoma daleko veća od genoma, te vjerojatno možemo govoriti i o milijun različitim proteinima značajnih za funkciju ljudskog organizma, među kojima brojni na direktan ili indirektnan način sudjeluju u raznim

imunoreakcijama. Konvencionalni testovi kao što je npr. 2D gel elektroforeza ili spektrometrija masa, iako su visoko učinkoviti, imaju svoja ograničenja i njihovom upotrebom može se propustiti detekcija i analiza mnogih različitih proteina važnih u dijagnostičkim postupcima, ali i analizi i istraživanju brojnih mehanizama važnih za razumijevanje određenih patoloških procesa i modulatorno, pa tako i imunomodulatorno djelovanje različitih supstancija na te procese. Obzirom da se većina, osobito kliničkih istraživanja i dijagnostičkih laboratorijskih pristupa bazira na najdostupnijem kliničkom materijalu, serumu ili plazmi, te da u analizi nastalih imunoreakcija često želimo detektirati različite citokine, kemokine, solubilne receptore i druge biomarkere, moderna medicinska znanost i laboratorijska dijagnostika se uskoro gotovo više neće moći zamisliti bez ove visoko osjetljive i specifične tehnologije za detekciju proteina. U farmaceutskoj industriji proteinski nizovi zasigurno će postati nezamjenjiva tehnologija u otkrivanju novih i poboljšavanju aplikacije postojećih lijekova [55–59].

Multipleks eseji na bazi kuglica – Novija multipleks metoda koja se razvila iz tradicionalne ELISA metode sa svrhom istovremenog mjerenja brojnih citokina i drugih solubilnih faktora u samo jednom uzorku. U ovoj tehnologiji koriste se setovi kuglica koje su omotane specifičnim "hvatajućim" antitijelima pomoću kojih se detektiraju različite molekule u biološkim uzorcima kao što su serum, plazma, urin, likvor i dr. Nakon toga vezanjem obilježenih detekcijskih antitijela na specifične komplekse na površini kuglica mogu se detektirati pojedine molekule prisutne u ispitivanom uzorku pomoću protočne citometrije. Danas komercijalno dostupni eseji omogućavaju mjerenje do 25 različitih molekula u istom uzorku, ali broj se može i povećavati ovisno o potrebama istraživača. U usporedbi s tradicionalnom ELISA metodom, ovakvi multipleks testovi imaju brojne prednosti u smislu da je potrebno znatno manja količina uzorka za analizu, mogućnost evaluacije razine pojedine molekule u kontekstu brojnih drugih molekula, korist u smislu uštede vremena i troškova, mogućnost ponavljanja mjerenja istog panela molekula u istom uzorku pod istim eksperimentalnim uvjetima i dr. [50].

3. Ostale multipleks tehnike

Osim gore opisanih metoda postoje i neke druge specifičnije multipleks tehnike koje se ne baziraju na mjerenju nukleinskih kiselina i proteina, niti ih koriste kao dio svog detekcijskog sistema. Kao jedan od primjera navodimo tehnologiju staničnih nizova/čipova (od engl. cellular microarray). Ovom multipleks metodom omogućeno je istraživanje živih stanica. Površina čipa ispunjena je poljima sačinjenim od različitih materijala kao što su antitijela, proteini, lipidi koji stupaju u interakciju sa stanicama te se vezati za njih na specifičnim ciljnim mjestima. Štoviše,

kombinacije pojedinih materijala na određenim mjestima omogućuju interakcije koje u stanicama mogu potaknuti određeni stanični odgovor, promjenu staničnog fenotipa ili pak detektirati specifičnu reakciju stanice na interakciju kao. npr. sekrecija određenog faktora [60, 61].

Još jedna vrsta čipova koja je svojim formatom vrlo slična DNK- ili proteinskom čipu naziva se tehnologija čipova kemijskih spojeva (od engl. chemical compound microarray) koju također čini čvrsta podloga na čiju su površinu nanešeni organski kemijski spojevi. Na području istraživanja u otkrivanju novih lijekova ovakva tehnologija omogućuje jednostavan način pretraživanja terapijskih ciljeva za potencijalno nove lijekove [62].

Zaključak

Imunomodulacija uzrokovana antibioticima predstavlja još uvijek neotkriveno i uzbudljivo područje medicine, kako za znanstvenike, tako i za kliničare praktičare, a osobito za farmaceutsku industriju. Značajan preduvjet za razvoj ove discipline i novih spoznaja predstavljaju moderne multipleks laboratorijske tehnologije koje nam mogu pomoći da sagledamo i barem dijelom shvatimo svu kompleksnost imunoreakcija odgovornih u složenim procesima imunomodulacije.

Literatura

- [1] URL: <http://inventors.about.com/od/pstartinventions/a/Penicillin.htm>
- [2] Calderon CB, Sabundayo BP. Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs. U: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. UK: CRC Press, Taylor & Frances group; 2007.
- [3] URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=antibiotics%20and%20immunomodulation>
- [4] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=antibiotics>
- [5] Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. Bull N Y Acad Med 1971;47:303–22.
- [6] Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol 2007;127: 514–25.
- [7] URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation>
- [8] Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol 2005;6:1191–7.
- [9] Serhan CN. Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. J Periodontol 2008;79(Suppl.8):1520–6.
- [10] Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. Clin Exp Immunol 2007;147:227–35.
- [11] Ashcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. Microbes Infect 1999;1: 1275–82.

- [12] Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:125–31.
- [13] Labro MT. Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl.B):37–46.
- [14] Zalewska-Kaszubska J, Górska D. Anti-inflammatory capabilities of macrolides. *Pharmacol Res* 2001;44:451–4.
- [15] Tamaoki J. The effects of macrolides on inflammatory cells. *Chest* 2004;125(Suppl.2):41S–50S; quiz 51S.
- [16] Giamarellos-Bourboulis EJ. Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:12–20.
- [17] Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13–23.
- [18] Aghai ZH, Kode A, Saslow JG, Nakhla T, Farhath S, Stahl GE, i sur. Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. *Pediatr Res* 2007;62:483–8.
- [19] Sharma S, Jaffe A, Dixon G. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics in respiratory disease: therapeutic implications for asthma and cystic fibrosis. *Paediatr Drugs* 2007;9:107–18.
- [20] Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, i sur. Clarithromycin inhibits NF-kappaB activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:44–7.
- [21] Aoki Y, Kao PN. Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2678–84.
- [22] Kamemoto A, Ara T, Hattori T, Fujinami Y, Imamura Y, Wang PL. Macrolide antibiotics like azithromycin increase lipopolysaccharide-induced IL-8 production by human gingival fibroblasts. *Eur J Med Res* 2009;14:309–14.
- [23] Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A, i sur. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1974–82.
- [24] Werber S, Shalit I, Fabian I, Steuer G, Weiss T, Blau H. Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NfkappaB activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:293–300.
- [25] Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Iovene MR, Tudisco L, Cozza V, i sur. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin and human beta-defensin 2 association in human lung epithelial cell line (A549) stimulated with lipopolysaccharide. *Peptides* 2007;28:2286–92.
- [26] Azuma Y, Ohura K. Alteration of constitutive apoptosis in neutrophils by quinolones. *Inflammation* 2003;27:115–22.
- [27] Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299:C539–48.
- [28] Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:258–65.
- [29] Rawal SY, Rawal YB. Non-antimicrobial properties of tetracyclines – dental and medical implications. *West Indian Med J* 2001; 50:105–8.
- [30] Kucuk A, Kabadere S, Tosun M, Koken T, Kinaci MK, Isikli B, i sur. Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney. *J Physiol Biochem* 2009;65:183–91.
- [31] Saliba R, Paasch L, El Solh A. Tigecycline attenuates staphylococcal superantigen-induced T-cell proliferation and production of cytokines and chemokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009;31:583–8.
- [32] Homsy S, Federico F, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, i sur. Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res* 2009;1291:122–32.
- [33] Jantzie LL, Todd KG. Doxycycline inhibits proinflammatory cytokines but not acute cerebral cytogenesis after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Psychiatry Neurosci* 2010;35:20–32.
- [34] Leite LM, Carvalho AG, Tavares Ferreira PL, Pessoa IX, Gonçalves DO, de Araújo Lopes A, i sur. Anti-inflammatory properties of Doxycycline and Minocycline in experimental models: an in vivo and in vitro comparative study. *Inflammopharmacology* 2011;19:99–110.
- [35] Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of clinically relevant inhibitors? *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2007;2:135–42.
- [36] Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, i sur. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306–21.
- [37] Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev* 2004;9:63–79.
- [38] Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of clinically relevant inhibitors? *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2007;2:135–42.
- [39] Lia NG, Shib ZH, Tang YP, Duan JA. Selective matrix metalloproteinase inhibitors for cancer. *Curr Med Chem* 2009;16:3805–27.
- [40] Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* 2007;12:1475–87.
- [41] Mohr S. Potential new strategies to prevent the development of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:189–98.
- [42] Vincent JA, Mohr S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1 beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 2007;56:224–30.
- [43] Gueders MM, Bertholet P, Perin F, Rocks N, Maree R, Botta V, i sur. A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergen-induced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma. *Biochem Pharmacol* 2008;75:514–26.
- [44] Lucey DR., Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine Dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532–62.
- [45] Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- α). *Curr Opin Immunol* 1997;9:17–23.
- [46] Doherty TM. T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol* 1995;7:400–4.
- [47] LeGros G, Erard F. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8+ T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 1994;6:453–7.

- [48] Brion CA. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994;6: 530–8.
- [49] URL: <http://www.freepatentsonline.com/6015804.html>
- [50] Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *Journal of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2008;63:879–84.
- [51] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. *Nat Biotechnol* 1998;16: 40–4.
- [52] Adomas A, Heller G, Olson A, Osborne J, Karlsson M, Nahalkova J, i sur. Comparative analysis of transcript abundance in *Pinus sylvestris* after challenge with a saprotrophic, pathogenic or mutualistic fungus. *Tree Physiol* 2008;28:885–97.
- [53] Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, Ghandour G, i sur. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999;22:164–7.
- [54] Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 2008;9:80.
- [55] URL:http://www.functionalgenomics.org.uk/sections/resources/protein_arrays.htm#applic
- [56] Pavlickova P, Knappik A, Kambhampati D, Ortigao F, Hug H. Microarray of recombinant antibodies using a streptavidin sensor surface self-assembled onto a gold layer. *Biotechniques* 2003;34: 124–30.
- [57] Niemeyer CM, Boldt L, Ceyhan B, Blohm D. DNA-Directed immobilization: efficient, reversible, and site-selective surface binding of proteins by means of covalent DNA-streptavidin conjugates. *Anal Biochem* 1999;268:54–63.
- [58] Chandra H, Reddy PJ, Srivastava S. Protein microarrays and novel detection platforms. *Expert Rev Proteomics* 2011;8:61–79.
- [59] Sevecka M, Wolf-Yadlin A, Macbeath G. Lysate microarrays enable high-throughput, quantitative investigations of cellular signaling. *Mol Cell Proteomics* 2011, u tisku.
- [60] Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, Brown PO. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol* 2003;1:E65.
- [61] Chen DS, Davis MM. Molecular and functional analysis using live cell microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 2006;10:28–34.
- [62] Ma H, Horiuchi KY. Chemical Microarray: a new tool for drug screening and discovery. *Drug Discovery Today* 2006;11:661–8.