

Perspektywy zastąpienia antybiotyków syntetycznych antybiotykami pochodzenia naturalnego w konserwacji nasienia ssaków

Gaetano Bollino

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Rozrzedzalniki używane do konserwacji i przechowywania nasienia muszą zawierać antybiotyki zapobiegające rozwojowi bakterii. Najbardziej rozpowszechnionymi antybiotykami służącymi do ochrony pobranego nasienia przed czynnikami patogennymi są: gentamycyna, linkomycyna, penicylina, streptomycyna i spektynomycyna.

W ostatnich latach podjęto próby zastąpienia antybiotyków syntetycznych antybiotykami pochodzenia naturalnego, uzyskując obiecujące rezultaty. Antybiotyki naturalne w wielu przypadkach wykazały się lepszym działaniem. Nie powodują odporności na leki, są atoksyczne, nie powodują zanieczyszczeń i są znacznie tańsze. Można zatem stwierdzić, że należałoby pogłębić badania z tego zakresu. Zanim będziemy badać rezultaty użycia konkretnych antybiotyków pochodzenia naturalnego, warto dokonać przeglądu opisanych dotąd substancji i ich działania.

Już w Starożytnej Grecji, Egipcie i Chinach w leczeniu zakażeń wykorzystywano niezwykle właściwości roślin i niektórych pleśni. Współczesne badania rozpoczęły się od obserwacji szkockiego bakteriologa Aleksandra Fleminga, który w 1922 roku odkrył lizozymę, a następnie w 1928 roku naturalną penicylinę (penicylina G lub penicylina benzylowa). Penicylina hodowana z *Penicilium notatum* działa przede wszystkim na ziarenkowce gram dodatnie, laseczki gram dodatnie (*Corynebacterium* i *Listeria*), beztlenowce i krętki.

W niemieckim Helmholtz Centre wy-

izolowane zostały: myxopyronina, corallopyronina i ripostatina, które wykazują niezwykle działanie jako antybiotyki. Działanie tych trzech substancji opiera się na blokowaniu polimerazy RNA, co uniemożliwia przekazanie czynnika patologicznego do DNA. Substancje te atakują enzym wiążąc go inaczej niż robią to wszystkie do dziś znane nam antybiotyki i w ten sposób blokują syntezę białek czynnika patologicznego. Ich olbrzymią zaletą jest to, że oddziałują również na bakterie odporne na działanie antybiotyków konwencjonalnych (Rolf i in., 2008).

Platensymycyna, wytwarzana przez mikroorganizmy żyjące w glebie – *Streptomyces platensis*, wykazuje silne działanie antybiotykowe na szerokie spektrum bakterii. Jako inhibitor FabF uniemożliwia bakterii wyprodukowanie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Wykorzystując substancję wydzielaną przez larwy much naukowcy z Uniwersytetu w Swansea (Wielka Brytania) wyprodukowali nowy antybiotyk działający na 12 szczepów gronkowca złocistego (Jon i in., 2006).

Badacze niemieccy z Uniwersytetu Christian-Albrechts w Kiel wynaleźli czynnik o właściwościach antybiotykowych – hydramycynę-1. Został on wyizolowany z hydry wielokomórkowego organizmu żyjącego w wodach słodkich. Przeprowadzone przez nich eksperymenty dowiodły, że jest on w stanie działać na duże spectrum bakterii niszcząc ich membranę (Sascha i in., 2009).

Makrolidy naturalne: erytromycyna (wytwarzana przez *Streptomyces erythreus*), olea-

domycyna (wytwarzana przez *Streptomyces antibioticus*), jozamicyna (wytwarzana przez *Streptomyces narbonensis*), midecamicina (wytwarzana przez *Streptomyces mycarofaciens*), spiramicyna (wytwarzana przez *Streptomyces ambofaciens*), rosaramicina (wytwarzana przez *Micromonospora rosaria*), także uważane są za bakteriostatyczne i bakteriobójcze dla dużej liczby bardziej wrażliwych mikroorganizmów, jak paciorkowce czy pneumokoki. Ich działanie polega na wiązaniu się z receptorem tRNA 23S oraz podjednostkami 50S rybosomu bakterii i unieczynnieniu syntezy białek RNA. Skuteczne są przeciwko ziarenkowcom gram dodatnim (gronkowce, paciorkowce, dwoinki), ziarenkowcom gram ujemnym (*Neisseria*), bakteriom gram dodatnim (*Corynebacterium*, *Bacillus anthracis* i *Listeria*), bakteriom gram ujemnym (*Campylobacteraceae*, pałeczki dżumy, *Legionella*) i bakteriom wewnątrz komórkowym (*Chlamydia*, *Mycoplasma* i *Ureaplasma*).

Fosfomicyna jest naturalnym antybiotykiem o kwaśnym odczynie, wyizolowanym w 1966 roku, produkowanym przez *Streptomyces fradiae*. Jest to antybiotyk o szerokim spektrum oddziaływania, zabójczy zarówno *in vitro*, jak też *in vivo* dla bakterii gram dodatnich (gronkowce, paciorkowce i enterokoki) oraz gram ujemnych (*E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophylus* itd.). Ponadto, wykazuje działanie przeciwko szczepom odpornym na inne antybiotyki, zwłaszcza gronkowcom penicylinoodpornym. Mechanizm działania fosfomicyny opiera się na hamowaniu pierwszego etapu syntezy peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii poprzez unieczynnienie enzymu transferazy fosfoenolopirogronianowej (Goodman i Gilman, 1997; Katzung, 1998; Noel i in., 1998).

Kolejnymi substancjami pochodzenia naturalnego o działaniu antybiotycznym są peptydy antymikrobowe. Można je wyodrębnić zarówno ze śluzówek, jak i tkanek wielu gatunków ryb. Nazywane są również AMPs lub CAPs. Są to niewielkie molekuły (od 12 do 50 aminokwasów) o działaniu przeciwbakteryjnym.

W ziarnistościach cytoplazmatycznych neutrofilów oraz w komórkach Panneth'a ssaków zidentyfikowano peptydy o szerokim spektrum działania antymikrobowego. Z motyla *Hyalophora cecropia* wyizolowano cecropine, peptyd o sil-

nych właściwościach antymikrobowych. Podobnie działające peptydy, takie jak: ceruleine, tachichinine, bradichinine i peptydy opioidowe stwierdzone zostały u wielu gatunków płazów, na przykład u żaby *Xenopus laevis*. Do molekuł o właściwościach antymikrobowych pochodzenia roślinnego należą przede wszystkim puroidolina a (PINA) i puroidolina b (PINB) obecne w ziarnach zbóż, fitoaleksyna proteiny PR, chitinaza, β -glukanaza, inhibitory proteinyazy, proteiny dezaktywujące rybosomy i proteiny bogate w cysteinę. Te ostatnie, dzięki obecności mostków dwusiarczkowych i trójwymiarowej strukturze łatwiej działają na membranę organizmów docelowych.

Pomimo różnic w ilości reszt aminokwasowych (od 10 do 40 aminokwasów) peptydy posiadają charakterystyczne cechy wspólne. Naładowane są dodatkowo (bogate w reszty lizyny i argininy), dlatego dochodzi do interakcji pomiędzy nimi a błoną bakteryjną bogatą w naładowane ujemnie fosfolipidy, takie jak na przykład fosfatydylseryna. W przypadku bakterii gram ujemnych peptyd reaguje z molekułami polianionowymi lipopolisacharydów błony zewnętrznej, a następnie jest w stanie rozszczelić ją i przedostać się do środka. W przypadku bakterii gram dodatnich natomiast, peptydy są prawdopodobnie przyciągane przez grupy anionowe, znajdujące się na zewnątrz warstwy peptydoglikanu. Są więc w stanie zahamować normalne funkcje błony bakteryjnej, rozpuszczając ją i powodując tworzenie kanałów jonowych lub pojawianie się defektów. Hamują następnie syntezę DNA i protein powodując śmierć komórkową.

Wyróżniono cztery podstawowe mechanizmy interakcji peptydów z błoną cytoplazmatyczną:

- 1) depolaryzację błony komórkowej,
- 2) przeniknięcie peptydu do membrany,
- 3) powstanie porów i utrata zawartości międzykomórkowej,
- 4) uszkodzenia podstawowych organów międzykomórkowych.

Ponadto, peptydy antymikrobowe wyróżniają się innymi cechami charakterystycznymi, które sprawiają, że są one niezwykle interesujące jako potencjalne narzędzia terapii:

- ↳ odznaczają się szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego,

- ↪ szybko działają (99,9% bakterii ginie w 20 min),
- ↪ działają w synergii z antybiotykami konwencjonalnymi,
- ↪ są skuteczne przeciwko rodzinom bakterii odpornych na antybiotyki,
- ↪ nie pozwalają na selekcję mutacji odpornych (Berti i Volpatti, 2007).

Z kolonii *Bacillus brevis* wyizolowane zostały antybiotyki polipeptydowe tyrocydyna A i gramicydyna S. Ich działanie przeciwbakteryjne polega na zdolności dezorganizacji błony plazmatycznej i tworzeniu porów, co w konsekwencji powoduje wzrost niekontrolowanej przepuszczalności. Pory ułatwiające przepuszczanie jonów tworzą się poprzez eliptyczne rozstawienie molekuł.

Tyrocydyna A jest aktywna przeciwko bakteriom gram dodatnim i gram ujemnym, gramicydyna S natomiast tylko przeciwko gram dodatnim (Goodman i Gilman, 1997; Katzung, 1998; Noel i in., 1988). Skóra ssaków zdolna jest do wydzielania peptydów o działaniu przeciwbakteryjnym. Na przykład, obecna w ludzkim pocie dermocydyna jest w stanie zabić wiele potencjalnie niebezpiecznych bakterii, jak *Escherichia coli* czy gronkowiec złocisty. Nie znamy jednak jeszcze sposobu działania dermocydyny. Podczas gdy większość peptydów jest naładowana dodatnio i dzięki temu może przebijać ściany komórkowe bakterii, ta nowa proteina naładowana jest ujemnie. Katelicydyna, obecna w nabłonku i neutrofilach, strukturą, spektrum działania antybakteryjnego i sposobem dystrybucji w tkankach przypomina dermocydynę. Skóra rekinów produkuje natomiast squalaminę, substancję o właściwościach antybakteryjnych i przeciwwzakaźnych, która jest w stanie zahamować podział komórkowy mikroorganizmów (Berti i Volpatti, 2007).

W ostatnim czasie grupa holenderskich badaczy odkryła w mleku peptyd nazwany nizyną, produkowany przez *Lactococcus lactis*. Nizyna powyżej pH 6,5 jest zabójcza dla bakterii gram dodatnich. Jest to molekula o charakterystycznych, dotychczas niespotykanych hybrydach. Może zabić bakterię zarówno perforując ścianę komórkową, która w ten sposób staje się przepuszczalna dla jonów (zwłaszcza dla potasu), jak i spowalniając odbudowę ścian. Dodatkową zaletą tego nowego leku jest jego zdol-

ność do działania w skupiskach nawet milion razy mniejszych niż w przypadku antybiotyków konwencjonalnych. Poza tym, jak dotychczas, nie wykazano odporności na ten antybiotyk (Wiedemann i in., 2001).

Naukowcy australijscy odkryli natomiast w mleku małego kangura Wallaby składnik przeciwbakteryjny 100 razy skuteczniejszy od penicyliny. Chodzi o AGG01, peptyd działający na bakterie gronkowca złocistego, *Escherichia coli*, paciorkowce, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* i *Proteus vulgaris*. Reaguje on z lipidami anionowymi w błonie komórkowej, tworząc pory, przez które wydostają się jony, powodując śmierć bakterii. Struktura błony bakteryjnej różni się od tej u ssaków. W ten sposób proteiny niszczą jedynie komórki patogenne (Liz, 2007).

Pierwszą naturalną substancją pochodzenia roślinnego, szeroko używaną jako antypiretyk była chinina. Jest to alkaloid otrzymywany z niektórych gatunków chinowców (tak zwanych drzew chinowych), znany z właściwości przeciwbakteryjnych. Działa hamując topoizomerazy bakterii: gyrazę DNA u bakterii gram ujemnych i topoizomerazę IV u bakterii gram dodatnich (Goodman i Gilman, 1997). Innymi substancjami pochodzenia roślinnego mającymi właściwości przeciwbakteryjne są allicyna i garlicyna otrzymywane z czosnku (*Allium sativum*); allicyna, cicloallina i siarczek allilu otrzymywane z cebuli (*Allium cepa*); lapachol, Lapachol-β, xyloidone, kwercetyna, carnosolo, tekmina, tumesterone, idoles, koenzym Q10, witamina K, antychinony, saponiny steroidowe oraz naftochinony otrzymywane z kory Pau d'Arco (*Tabebuia avellanadae* i *Tabebuia impetiginosa*). Otrzymywana z grejpfruta naringina jest skuteczna przeciwko wielu rodzajom bakterii.

Glutation, zwany inaczej GSH, to trójpeptyd zbudowany z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Znajduje się w awokado, arbusach, szparagach, grejpfrutach, ziemniakach, truskawkach, pomidorach, pomarańczach, melonach, marchwi, szpinaku, brzoskwiniach itd. Ma właściwości przeciwutleniające, a dodany do nasienia świni, schłodzonego następnie do temperatury 10°C na okres 70 dni, doskonale je konserwuje (Funahashi i Sano, 2005).

Kannabinoidy naturalne otrzymywane

z *Cannabis*, rośliny o właściwościach psychotropowych, ale również jednej z mocniejszych substancji przeciwbakteryjnych, są w stanie pokonać nawet tak zwane „super robale”. Redukują one rozprzestrzenianie się niektórych bakterii odpornych na działanie antybiotyków, np. gronkowca złocistego odpornego na penicylinę (MRSA). Kannabinoidy CBD i CBG, oba nie posiadające właściwości psychotropowych, okazały się być niezwykle aktywne przeciwko MRSA-15 i MRSA-16, dwóm z najbardziej zjadliwych szczepów gronkowców (Appendino i in., 2008).

Właściwości antibakteryjne wykazują także olejki eteryczne. Zawierają one różne typy substancji, jak: metalcavicol, cineol (eucaliptol), linaliol w oleju otrzymanym z liści bazylii (*Ocimum basilicum*); octan linalylu w oleju otrzymanym z owoców bergamotki (*Citrus bergamia*); eugenol, safrol i octan eugenylu w oleju otrzymywanym z młodych gałązek cynamonu (*cinnamomum verum*); flawonoidy, eugenol i kariofilen w oleju otrzymanym z kory i liści drzewa goździkowego (*Eugenia caryophyllata*); glikozydy siarczkowe w oleju z rukwi wodnej (*Nasturtium officinale*); octan linalylu, borneol, terpineol-4, linalyl, cineol (*eucaliptol*), kumaryna, taniny, kwas rozmarynowy, linaliol i kamfora w oleju z kwiatów lawendy (*Lavandula angustifolia*, *lavandula abrialis*); limonen, β -pinen, γ -tetrypinen, cytral, flawonoidy, karotenoidy i kumaryna w oleju ze skórek cytryny (*Citrus limonum*); karwakrol, tymol, itosterina w oleju z czubricy ogrodowej (*Santureja hortensis*); glikozydy o właściwościach antybiotykowych w oleju z gorczycy (*Brassica nigra*, *Brassica alba*, *Brassica juncea*); terpinene, pinen, cineol (*eucaliptol*) w oleju otrzymanym z drzewa herbacianego Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) (Anitra, 1996); tymol i karwakrol w oleju z czerwonej macierzanki (*Thymus vulgaris*) i oregano (*Origanum vulgare*), aktywne zwłaszcza przeciwko bakteriom: *Proteus*, gronkowcom, paciorkowcom, *Neisseria* i maczugowcom. Ponadto, włoska Union B.I.O. przygotowała wodnisty preparat na bazie oliwy z oliwek, bogaty w polifenole, antybiotyki naturalne i żywe kultury bakterii, działający na gronkowca złocistego i bakterie *E. coli*.

Badania prowadzone przez prof. Petera

Molana z uniwersytetu Waikato w Nowej Zelandii wykazują, że miód z drzewa manuka (*Leptospermum scoparium*) ma naturalne właściwości przeciwbakteryjne. Z badań wynika, że właściwości te wynikają nie tylko z obecności nadtlenu wodoru, naturalnego środka antyseptycznego, wytwarzanego podczas oksydazy glukozowej, ale przede wszystkim z obecności innego czynnika, nazywanego UMF. Czynnikiem ten jest obecny jedynie w niektórych gatunkach miodu z drzewa manuka (*Leptospermum scoparium*). Wydaje się on być odporny na katalizę częściowo dezaktywującą nadtlenu wodoru i następnie redukującą właściwości przeciwbakteryjne miodu, z czym mamy do czynienia w przypadku zwykłego miodu.

Czynnik UMF oznacza stopień aktywności antibakteryjnej miodu z manuka. Na przykład, UMF 10 oznacza, że aktywność przeciwbakteryjna jest równa 10% roztworowi fenolu. Miód z manuka jest odporny na ciepło i nie wymaga specjalnych warunków klimatycznych, aby działać przeciwko szerokiej gamie bakterii: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, gronkowcu złocistemu i *Salmonella typhimurium* (Molan i Russell, 1988; Cooper i in., 1999).

Dzięki kwasowi benzoesowemu, galanginowi i pinocembrynie, propolis jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania. W wielu badaniach, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, wykazano, że propolis w stężeniu od 10 do 20% hamuje rozwój wielu szczepów bakterii gram dodatnich, jak *Escherichia coli*, *Proteus salmonelli*. Jad pszczele, substancja o zdecydowanie kwaśnym odczynie, niezwykle łatwo rozpuszcza się w wodzie oraz w kwasach i jest termostabilna. Dobrze znosi zarówno podgrzewanie przez 10 dni w temperaturze 100°C i zamrażanie, a procesy te nie osłabiają jej działania. Przechowywana w glicerynie nie traci swych właściwości trujących, a roztwór 0,1% jadu pszczelego hamuje rozwój paciorkowców. Jad pszczele jest substancją wolną od bakterii i w pewnej mierze zapobiega ich rozwojowi.

Kolejnymi antybiotykami naturalnymi są: srebro koloidowe oraz nadmanganian potasu (KMnO₄). Pierwszy jest minerałem, występuje w ziemi i jest w stanie zabić w przeciągu 6 minut wszelkie bakterie, z którymi się zetknie. Jest szczególnie aktywny przeciwko *Streptococcus*

pyogenes, gronkowcowi złocistemu, *Neisseria genorrhoeae* i *Gardnerella vaginalis*. Nie jest toksyczny. Nadmanganian potasu ma silne właściwości utleniające. W momencie, kiedy uda mu się dostać do komórki powoduje jej śmierć za pomocą utleniania i wytrącania protein cytoplazmatycznych. Jest niezwykle aktywny w temperaturze pokojowej i w skupisku 30 000 ppm.

Podsumowanie

Ten z konieczności pobieżny przegląd opisanych dotąd antybiotyków pochodzenia naturalnego otwiera znaczne pole możliwości ich użycia do konserwacji nasienia różnych gatunków zwierząt oraz poszukiwania optymalnych i skutecznych dawek i kombinacji tych naturalnych substancji o właściwościach antybiotyków.

Literatura

- Anitra C. (1996). Therapeutic properties of New Zealand and Australian tea trees (*Leptospermum* and *Melaleuca*). *New Zealand Pharmacy*, 18 (2): 29–31.
- Appendino et al. (2008). Antibacterial cannabinoids from *cannabis sativa*: A structure–activity study. *J. Nat. Prod.*, 71 (8): p. 1427.
- Berti P., Volpatti D. (2007). I peptidi antimicrobici dei pesci. *Ittiopatologia*, 4: 199–206.
- Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *R. Soc. Medjune*, 92 (6): 283–285.
- Funahashi H., Sano T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*, 1, 63 (6): 1605–1616.
- Goodman & Gilman (1997). *Le basi farmacologiche della terapia*. pp. 1106–1110.
- Jun W., Stephen M. et al. (2006). Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, 441: 358–361.
- Katzung B.G. (1998). *Farmacologia generale e clinica*. Terza edizione, pp. 801–802.
- Liz W. (2007). Anti-superbug weapon developed from wallaby milk. *Cosmos*.
- Molan P.C., Russell K.M. (1988). Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J. Apic. Res.*, 27, 1: 62–67.
- Noel A., Trieu Cuot P., Courvalin P. (1988). Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *Suppl. B*: 13–23.
- Rolf J., Herbert I. et al. (2008). The RNA polymerase Switch Region” is a target for inhibitors. *Cell*, 135 (2): 295–307.
- Sascha J., Andrew J. et al. (2009). Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan *Hydra*. *J. Biol. Chem.*, 284: 1896–1905.
- Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 19; 276 (3): 1772–1779.

PROSPECTS FOR REPLACING SYNTHETIC ANTIBIOTICS WITH NATURAL ANTIBIOTICS IN CONSERVATION OF MAMMALIAN SEMEN

Summary

Extenders used for semen preservation and storage must contain antibiotics that inhibit bacterial growth. The most popular antibiotics that protect semen samples from pathogenic agents are gentamicin, lincomycin, penicillin, streptomycin and spectinomycin.

Recent attempts at replacing synthetic antibiotics with natural antibiotics have shown promising results. In many cases, natural antibiotics produced better results. In addition, they do not develop resistance to drugs, are not toxic, cause no contamination and are much less expensive. This suggests that they should be subjected to more extensive research.

The present review of known natural antibiotics shows that they have a wide scope of use for preservation of semen of different animal species and should encourage a search for optimum and efficient doses and combinations of these natural substances with antibiotic properties.