

Received: 2010.04.19
Accepted: 2010.07.12
Published: 2010.07.23

Biomedyczna aktywność biosurfaktantów

Biomedical activity of biosurfactants

Anna Krasowska

Zakład Biotransformacji, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Biosurfaktanty, związki amfifilowe, syntetyzowane przez mikroorganizmy, oprócz właściwości powierzchniowo czynnych, często wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową. Związki te zapobiegają adhezji mikroorganizmów do różnych podłoży, dzięki czemu nie tworzą się biofilmy bakteryjne czy grzybowe. Od wielu lat biosurfaktanty są stosowane jako antybiotyki, gdyż zabijają wiele różnych drobnoustrojów. Znane też są właściwości przeciwwirusowe biosurfaktantów. Coraz więcej doniesień literaturowych informuje o wywoływaniu apoptozy przez mikrobiologiczne surfaktanty. W pracy omówiono aktualny stan wiedzy dotyczący biomedycznej aktywności biosurfaktantów.

Słowa kluczowe:

biosurfaktanty • aktywność przeciwnowotworowa • aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Summary

Biosurfactants, amphiphilic compounds, synthesized by microorganisms have surface, antimicrobial and antitumor properties. Biosurfactants prevent adhesion and biofilms formation by bacteria and fungi on various surfaces. For many years microbial surfactants are used as antibiotics with board spectrum of activity against microorganisms. Biosurfactants act as antiviral compounds and their antitumor activities are mediated through induction of apoptosis. This work presents the current state of knowledge related to biomedical activity of biosurfactants.

Key words:

biosurfactants • antitumor activity • antimicrobial activity

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=915101>

Word count:

1475

Tables:

–

Figures:

–

References:

28

Adres autorki:

dr Anna Krasowska, Zakład Biotransformacji, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: aniak@biotrans.uni.wroc.pl

Wykaz skrótów:

CLP – cykliczne lipopeptydy; **ERK** – kinaza zależna od sygnału zewnątrzkomórkowego (extracellular signal-regulated protein kinase); **HSV** – wirus z rodziny herpeswirusów; **JNK** – kinaza aktywowana przez wolne rodniki (c-Jun amino-terminal kinase); **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa; **PARP** – poly(ADP-ribozo)polimeraza; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SFV** – otoczkowy wirus z rodziny toga wirusów.

WSTĘP

Surfaktanty (surface active agents), inaczej substancje powierzchniowo czynne, to związki chemiczne, które mają zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego cieczy, ułatwiając tym samym zwilżanie powierzchni ciał stałych przez te cieczce, a także umożliwiając zmieszanie dwóch płynów, które naturalnie tworzą dwie nieulegające mieszanii fazy (np. woda i olej).

Surfaktanty są związkami chemicznymi o własnościach amfifilowych. Są to związki mające właściwości zarówno hydrofilowe, jak i hydrofobowe.

Mikroorganizmy syntetyzują różnorodne biosurfaktanty, które można podzielić m.in. pod względem masy cząsteczkowej. Do niskocząsteczkowych należą glikolipidy (zwłaszcza trehalozolipidy, soforolipidy, ramnolipidy) oraz lipopeptydy, takie jak: cykliczne lipopeptydy, np. surfaktyna oraz polimyksyna. Jeszcze inną grupą biosurfaktantów są cykliczne peptydy, będące często antybiotykami, takimi jak między innymi gramicydyna. Do wysokocząsteczkowych biosurfaktantów należą lipopolisacharydy, biopolimerowe kompleksy i lipoproteiny, takie jak alasan, liposan oraz kompleksy złożone z tych biopolimerów [16].

Bakterie i drożdże wytwarzają biosurfaktanty, wykorzystując jako źródło węgla różne, niemieszające się wzajemnie substraty węglowe (hydrofilowe i hydrofobowe): cukry i tłuszcze roślinne, tłuszcze zwierzęce i ich estry, kwasy tłuszczowe i alkohole. Wytwarzanie biosurfaktantów występuje w fazie stacjonarnej wzrostu, co sugeruje akumulację tych związków jako wtórnych, dodatkowych metabolitów. Na wytwarzanie biosurfaktantów ma wpływ wiele czynników, takich jak: źródło węgla, pH, temperatura czy biodostępność substratów [17].

Związki aktywne powierzchniowo otrzymywane w wyniku mikrobiologicznej syntezy są zazwyczaj metabolitami amfifilowymi, zewnątrzkomórkowymi bądź związanymi ze ścianą komórkową. Ich część hydrofilową stanowią najczęściej mono-, oligo- lub polisacharydy, aminokwasy, białka itp. W składzie części lipofilowej biosurfaktantów występuje jeden lub więcej długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, hydroksykwasów tłuszczowych lub α -alkilobeta-hydroksykwasów tłuszczowych zawierające 30–40 atomów węgla w cząsteczce. Są one zestyfikowane poprzez grupę acylową lub wiązanie glikozydowe z częścią hydrofilową surfaktantu [17].

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE BIOSURFAKTANTÓW

Glikolipidy są biosurfaktantami, między innymi o właściwościach przeciwnowotworowych. Ich rola w hamowaniu rozwoju nowotworów została potwierdzona przez wielu badaczy. Glikolipidy mogą hamować rozwój raka płuc, mózgu czy białaczek [7,21,27]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego glikolipidów polega na hamowaniu angiogenezy [10] i indukowaniu apoptozy [28]. Apoptoza jest rodzajem śmierci komórki, pozwalającej na endogenne samobójstwo komórki, aktywowane przez zewnętrzne lub wewnętrzne bodźce. Jest to bardzo ważny mechanizm, pozwalający utrzymać równowagę między powstającymi i umierającymi komórkami oraz homeostazę

w populacji komórek. Jest to proces ważny ze względu na niszczenie komórek uszkodzonych, zainfekowanych oraz nowotworowych.

Soforolipidy to grupa biosurfaktantów zaliczana ze względu na swoją strukturę chemiczną do glikolipidów. Obecnie intensywnie badany jest wpływ soforolipidów na proliferację i apoptozę w komórkach linii nowotworowej H7402 raka wątroby. Do hamowania proliferacji ważne są odpowiednie stężenie soforolipidów oraz czas inkubacji [17]. Glikolipidy te wywołują apoptozę poprzez blokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 oraz częściowo w fazie S, powodując aktywację kaspazy 12, następnie kaspazy 3, oraz zależnej od Ca/Mg endonukleazy, zwiększając stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie.

Apoptoza może być wywołana przekazaniem sygnału z retikulum endoplazmatycznego. Uwolnienie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy, prowadzi do podniesienia stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Opierając się na tych badaniach, można przypuszczać, że apoptoza komórek H7402 wywołana przez soforolipidy może być zależna od szlaku sygnałowego w retikulum [4].

Wykazano, że soforolipidy mogą być wykorzystane także w terapii raka trzustki [5]. Soforolipidy były cytotoksyczne względem nowotworu trzustki, wywołując uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH), co z kolei wskazuje na zmiany nekrotyczne w tym procesie.

Inna grupa biosurfaktantów, cyklicznych lipopeptydów (CLP) od kilku lat jest badana pod względem ich przeciwnowotworowych właściwości. Wiadomo, że potraktowanie lipoproteinami mysich komórek czerniakowych B16 wywołuje kondensację chromatyny, fragmentację DNA oraz zatrzymanie wzrostu w fazie sub-G1 [24]. Sudo i wsp. zaobserwowali zahamowanie wzrostu i różnicowanie się komórek promielocytarnej białaczki linii HL60 pod wpływem lipoprotein [19]. Cykliczny lipopeptyd wydzielany przez szczep *Bacillus natto* T-2 indukował apoptozę w komórkach białaczki linii K562, następową aktywacją kaspazy 3 i rozszczepienie poly(ADP-ribozo)polimerazy (PARP) [26]. Dalsze badania nad apoptozą indukowaną przez CLP z *Bacillus natto* wykazały, że proces ten jest sterowany przez aktywowaną wzrostem stężenia wapnia ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) poprzedzoną przez aktywację Bax/Bcl-2 i cytochromu c. Przypuszcza się, że ze względu na swoją różnorodną strukturę i rolę biologiczną cykliczne lipopeptydy mogą się charakteryzować własnym, unikalnym schematem sygnałowego hamowania rozwoju nowotworów [25].

Znany cykliczny lipopeptyd – surfaktyna, wydzielany przez szczep *Bacillus*, również hamuje proliferację i wywołuje apoptozę w komórkach raka piersi. W tym przypadku mechanizm indukcji apoptozy polega na indukcji powstawania reaktywnych form tlenu i zaburzeniu homeostazy redox na 13 ROS/JNK – zależnym mitochondrialno/kaspazowym szlaku [3].

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWWIRUSOWE BIOSURFAKTANTÓW

Od kilkunastu lat prowadzone są badania nad przeciwwirusowymi właściwościami biosurfaktantów. Naruse, Itokawa

i wsp. przebadali aktywność surfaktyny i jej analogu pumilacydyny na wirusa HIV-1 i opisali jej potencjalne zastosowanie jako czynnika przeciwwirusowego [8,12].

Dirk Volleinbroch i wsp. przebadali wpływ surfaktyny na różne wirusy, odkrywając jej działanie przeciw wirusom herpes, retrowirusom oraz innym otoczkowym wirusom z RNA i DNA [23]. Surfaktyna nie niszczyła wirusa SFV – otoczkowego wirusa z rodziny togawirusów, używanego jako przykład modelowy wirusa żółtaczkę C. Testowany biosurfaktant bezpośrednio reagował z częścią lipidową otoczki wirusa, powodując w większych stężeniach nawet całkowite jej zniszczenie. Zauważono także, że surfaktyna dezaktywowała wirusy pod względem ich adsorpcji i przenikania do komórek [23].

Rhamnolipid, należący do grupy glikolipidów, wydzielany przez szczep *Pseudomonas* sp. S-17 wykazywał przeciwvirusową aktywność wobec wirusów *herpes simplex* typu 1 i 2 (HSV1 i 2) [14].

Inny rodzaj glikolipidów – soforolipidy oraz ich strukturalne analogi zostały zastosowane przez Vishal Shah i wsp. między innymi przeciw wirusowi HIV, przy czym wykazywały różny stopień selektywności w swoich bakterio-bójczych, antywirusowych i plemnikobójczych właściwościach. Na przykład postać laktonowa soforolipidów wykazywała silne właściwości plemnikobójcze, cytotoksyczne oraz prozapalne, ale mniejsze działanie antywirusowe. Pierścień soforolipidów warunkował słabszą aktywność plemnikobójczą, ale silniejszą antywirusową. Pochodna soforolipidów, ester dioctanu etylu wykazywała najwyższą aktywność plemnikobójczą i anty-HIV spośród przebadanych pochodnych. Niestety związki te miały zbyt dużą cytotoksyczność, żeby móc je wykorzystać jako środki lecznicze [18].

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE I PRZECIWGRZYBICZE BIOSURFAKTANTÓW

Niektóre z biosurfaktantów mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a takie jak polimyksyny czy gramicydyny od dawna mają zastosowanie jako antybiotyki.

Polimyksyny są stosowane w lecznictwie od 1947 roku, ich zakres przeciwbakteryjnego działania obejmuje prawie wszystkie bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, z wyjątkiem pałeczek rodzaju *Proteus* i gatunku *Serratia marcescens*. Dużą wrażliwość wykazują także szczepy pałeczek niefermentujących z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* oraz pałeczki *Haemophilus influenzae* i *Bordetella pertussis*. Do opornych na polimyksyny gatunków Gram-ujemnych pałeczek należą *Burkholderia cepacia* i *Bacteroides fragilis*, a do opornych ziarniaków Gram-ujemnych, bakterie z rodzaju *Neisseria*. Z klinicznego punktu widzenia ważna jest duża aktywność polimyksyn wobec Gram-ujemnych patogenów przewodu pokarmowego, patogenów układu moczowego i szczepów powodujących zapalenie płuc u chorych z mukowiscydozą. Istotną jest ich aktywność wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa*.

Wiązanie się polimyksyn z błonami komórek ssaków prowadzi do akumulacji tych antybiotyków w tkankach. Polimyksyny po podaniu pozajelitowym wykazują dużą toksyczność. Antybiotyki te działają nefrotoksycznie, co

dotyczy około 20% pacjentów. U około 2% leczonych osób obserwuje się ostrą martwicę kanalikową.

Do początku XXI wieku terapeutyczne użycie polimyksyn było ograniczone. Stosowano je w terapii zakażeń przewodu pokarmowego wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne oraz do selektywnej dekontaminacji przewodu pokarmowego u pacjentów oddziałów intensywnej terapii. Służyły także do leczenia zakażeń wywoływanych przez szczepy *P. aeruginosa* (zakażenia układu moczowego, zapalenie płuc u chorych na mukowiscydozę, zakażenia oczu, uszu, powierzchniowe, np. zakażenia skóry, ran oparzeniowych).

Polimyksyny w połączeniu np. z neomycyną i bacytracyną, dzięki skojarzonemu działaniu, stanowią bakterio-bójczy preparat stosowany miejscowo. Takie preparaty pod postacią maści mają zastosowanie w pierwotnych i wtórnych zakażeniach skóry paciorkowcowych i gronkowcowych, a także, co szczególnie ważne, w zakażeniach pałeczkami Gram-ujemnymi w tym z rodzaju *Pseudomonas*.

Obecnie polimyksyny znajdują zastosowanie w zwalczaniu chorób wywołanych lekoopornymi szczepami bakterii, takimi jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* czy *Stenotrophomonas maltophilia* [6].

Gramicydyny stosowane od 1939 roku, działają na bakterie Gram-dodatnie. Wrażliwe są także *Mycobacterium*. Wydzielane są przez szczep *Bacillus brevis*. Ze względu na dużą toksyczność stosowane są jedynie miejscowo, w leczeniu infekcji skóry i błon śluzowych. Ich mechanizm działania polega na dobudowywaniu się do błony komórkowej i tworzeniu w niej kanałów, przez które przepływają kationy w ilości 10^7 na sekundę [9].

Biosurfaktanty ze względu na swoją zdolność obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz, mogą chronić różnego rodzaju powierzchnie przed przyleganiem do nich mikroorganizmów i dlatego są obiecującymi związkami, które mogą znaleźć zastosowanie w medycynie [1,13,15]. Adhezja mikroorganizmów do np. protez wewnętrznych jest często przyczyną rozwinięcia się w takich miejscach biofilmu, powodującego zakażenia i bardzo trudnego do usunięcia.

Zaobserwowano, że biosurfaktanty wydzielane przez probiotyczny szczep *Streptococcus thermophilus* hamują adhezję grzyba *Candida albicans* do silikonowych powierzchni [2], a biosurfaktant wytwarzany przez *Lactobacillus acidophilus* hamuje adhezję do silikonu nie tylko *Candida albicans*, ale również bakterii uropatogennych [22].

Ponadto stwierdzono hamowanie formowania biofilmu *Salmonella enterica* pod wpływem surfaktyny na ściankach płytki mikrotitracyjnej wykonanej z polichlorku winylu oraz na cewnikach urologicznych. Podobne wyniki uzyskano z użyciem innych surfaktantów pochodzenia chemicznego i biologicznego. Surfaktyna (podobnie jak syntetyczny surfaktant Tween 80) ma działanie rozpraszające wstępnie uformowany biofilm bez wpływu na wzrost komórek, dzięki czemu zabezpiecza przed formowaniem się biofilmu na cewnikach urologicznych przez organizmy, takie jak *S. enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas mirabilis* [11].

PODSUMOWANIE

Mimo że na świecie znanych i stosowanych jest wiele związków, wykazujących aktywności przeciwdrobnoustrojowe i/lub przeciwnowotworowe, wciąż poszukiwane są

nowe substancje wytwarzane m.in. przez drobnoustroje. Biosurfaktanty mogą być dobrymi, potencjalnymi związkami, nie tylko dezynfekującymi, ale również – po odpowiednich testach klinicznych – lekami wspomagającymi leczenie nowotworów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.: Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000; 53: 495–508
- [2] Busscher H.J., van Hoogmoed C.G., Geertsema-Doornbusch G.I., van der Kuijl-Booij M., van der Mei H.C.: *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63: 3810–3817
- [3] Cao X.H., Wang A.H., Wang C.L., Mao D.Z., Lu M.F., Cui Y.Q., Jiao R.Z.: Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chem. Biol. Interact.*, 2010; 183: 357–362
- [4] Chen J., Song X., Zhang H., Qu Y.B., Miao J.Y.: Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 72: 52–59
- [5] Fu S.L., Wallner S.R., Bowne W.B., Hagler M.D., Zenilman M.E., Gross R., Bluth M.H.: Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. *J. Surg. Res.*, 2008; 148: 77–82
- [6] Giamarellou H., Poulakou G.: Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs*, 2009; 69: 1879–1901
- [7] Isoda H., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T.: Succinoyl trehalose lipid induced differentiation of human monocytoid leukemic cell line U937 into monocyte-macrophages. *Cytotechnology*, 1995-1996; 19: 79–88
- [8] Itokawa H., Miyashita T., Morita H., Takeya K., Hirano T., Homma M., Oka K.: Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis* natto. *Chem. Pharm. Bull.*, 1994; 42: 604–607
- [9] Khandelia H, Ipsen J.H., Mouritsen O.G.: The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 1528–1536
- [10] Matsubara K., Matsumoto H., Mizushima Y., Mori M., Nakajima N., Fuchigami M., Yoshida H., Hada T.: Inhibitory effect of glycolipids from spinach on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *Oncol. Rep.*, 2005; 14: 157–160
- [11] Mireles R.J. II, Toguchi A., Harshey R.M.: *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5848–5854
- [12] Naruse N., Tenmyo O., Kobaru S., Kamei H., Miyaki T., Konishi M., Oki T.: Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.*, 1990; 43: 267–280
- [13] Neu T.R.: Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.*, 1996; 60: 151–166
- [14] Remichkova M., Galabova D., Roeva I., Karpenko E., Shulga A., Galabov A.S.: Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Z. Naturforsch. C*, 2008; 63: 75–81
- [15] Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.: Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 609–618
- [16] Ron E.Z., Rosenberg E.: Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, 2001; 3: 229–236
- [17] Rosenberg E., Ron E.Z.: High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999; 52: 154–162
- [18] Shah V., Doncel G.F., Seyoum T., Eaton K.M., Zalenskaya I., Hagver R., Azim A., Gross R.: Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 4093–4100
- [19] Sudo T., Zhao X., Wakamatsu Y., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Suzuki A., Kobayashi Y., Jin C., Murata T., Yokoyama K.K.: Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. *Cytotechnology*, 2000; 33: 259–264
- [20] Van Bogaert I.N., Saerens K., De Muyneck D., Develter D., Soetaert W., Vandamme E.J.: Microbial production and application of sophorolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 76: 23–34
- [21] Van Brocklyn J.R.: Sphingolipid signaling pathways as potential therapeutic targets in gliomas. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007; 7: 984–990
- [22] Velraeds M.M., van der Mei H.C., Reid G., Busscher H.J.: Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus isolates*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62: 1958–1963
- [23] Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R.M., Pauli G.: Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 1997; 25: 289–297
- [24] Wakamatsu Y., Zhao X., Jin C., Day N., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Murata T., Yokoyama K.K.: Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK-related signal cascade. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 374–383
- [25] Wang C.L., Ng T.B., Cao X.H., Jiang Y., Liu Z.K., Wen T.Y., Liu F.: CLP induces apoptosis in human leukemia K562 cells through Ca²⁺ regulating extracellular-related protein kinase ERK activation. *Cancer Lett.*, 2009; 276: 221–227
- [26] Wang C.L., Ng T.B., Yuan F., Liu Z.K., Liu F.: Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* natto T-2. *Peptides*, 2007; 28: 1344–1350
- [27] Wu P., Qi B., Zhu H., Zheng Y., Li F., Chen J.: Suppression of staurosporine-mediated apoptosis in Hs578T breast cells through inhibition of neutral-sphingomyelinase by caveolin-1. *Cancer Lett.*, 2007; 256: 64–67
- [28] Zhu X.F., Zhang X.S., Li Z.M., Yao Y.Q., Xie B.F., Liu Z.C., Zeng Y.X.: Apoptosis induced by ceramide in hepatocellular carcinoma Bel7402 cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2000; 21: 225–228

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.