



## Wybrane aspekty zwalczania bakterii lekoopornych

### Selected aspects of combat drug-resistance bacteria

Monika LEWAŃSKA,<sup>1,\*</sup> Dominika OLSZEWSKA,<sup>2</sup> Agnieszka GODELA,<sup>1</sup> Magdalena MYGA-NOWAK,<sup>1</sup> Magdalena KUBERSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Nauk Biomedycznych, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska;

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska

#### Zawartość

1. Wstęp.....	79
2. Rozwój bakterii lekoopornych.....	80
3. Alternatywne metody zwalczania bakterii.....	80
3.1. Bakteriofagi.....	80
3.2. Hydrolazy ściany komórkowej bakterii (BCWH).....	81
3.3. Peptydy antibakteryjne (AMP).....	81
3.4. Inhibitory lipopolisacharydów (LPS).....	82
3.5. Ingerencja w mechanizm <i>Quorum Sensing</i> (QS).....	82
3.6. Przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna (PACT).....	82
3.7. Substancje fitochemiczne.....	83
4. Podsumowanie.....	84
Literatura.....	84

**Streszczenie:** W pracy przedstawiono problem związany z obecnością bakterii lekoopornych oraz zestawienie danych literaturowych na temat sposobów ich zwalczania. Oporność na antybiotyki wynika z wykształcenia mechanizmów obronnych przez mikroorganizmy. Rozwiązań lekooporności poszukuje się zarówno w tradycyjnych sposobach, jak i innowacyjnych metodach, wynikających z rozwoju współczesnej nauki. Związki antibakteryjne pochodzenia naturalnego to między innymi powszechnie występujące bakteriofagi, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, hydrolazy ściany komórkowej bakterii, inhibitory systemu *Quorum sensing*, inhibitory lipopolisacharydów czy fitonocydy. Do metod innych niż te zaczerpnięte z natury zaliczamy przede wszystkim terapię fotodynamiczną. Dogłębna analiza wszystkich dostępnych alternatyw dla obecnych antybiotyków z pewnością przyczyni się do rozwoju współczesnej medycyny i pozwoli ograniczyć zjawisko szerzącej się oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe.

**Słowa kluczowe:** lekooporność, bakteriofagi, BCWH, AMP, LPS, *Quorum sensing*, PACT, fitonocydy

**Abstract:** This work presents the problem of drug-resistant bacteria and a review of the literature on how to fight them. Antibiotic immunity is related to various mechanisms of resistance developed by these dangerous pathogenic microorganisms. Solutions are being sought in the traditional methods and recent innovative methods resulting from the development of modern science. Antimicrobial compounds from natural product are *inter alia* antimicrobial peptides, bacterial cell wall hydrolases, *Quorum sensing* inhibitors, LPS inhibitors and phytoncides. Other methods than those taken from nature are mainly photodynamic therapy. Analysis of all alternatives to existing antibiotics will help to contemporary medicine to restrain spreading tolerance against antimicrobial drugs.

**Keywords:** drug-resistance, bacteriophages, BCWH, AMP, LPS, *Quorum sensing*, PACT, phytoncides

#### 1. Wstęp

Mikroorganizmy od wieków stanowią poważne zagrożenie dla ludzi, którzy wypracowali przeciw nim proste mechanizmy obronne. Na przestrzeni lat bakterie były przyczyną śmierci ogromnej liczby ludzi i zwierząt. Antybiotyki były istotnym elementem triumfalnego okresu dwudziestowiecznej medycyny. Po raz pierwszy penicyliny, wytwarzane przez pleśń *Penicillium*, zostały nazwane przez Aleksandra Fleminga w 1928 ro-

ku. Natomiast penicylina, jako lek została opracowana przez Normana Heatley Ernst Chain i Howarda Florey podczas trwania wojny w Anglii. Antybiotyki pozwalały na leczenie chorób dotychczas nieuleczalnych, ponadto były bardziej skuteczne i powodowały mniej efektów ubocznych niż stosowane wcześniej sulfonamidy. Spowodowało to okrzyknięcie penicyliny cudownym lekiem [1]. Obecnie masowa produkcja antybiotyków oraz ich szerokie zastosowanie zarówno w medycynie, jak i w celach niemedycznych (hodowli zwierząt, rolnictwie itp.), w sposób znaczący powiększa pulę antybiotyków znajdujących się w środowisku, a tym samym, przyczynia się do narastania zjawiska antybiotykooporności [2]. Oporność na

\* Autor korespondencyjny.  
Adres e-mail: [monika.lewanska@ajd.czest.pl](mailto:monika.lewanska@ajd.czest.pl) (M. Lewańska).

środki przeciwdrobnoustrojowe uderza w sedno nowoczesnej medycyny oraz globalnej, skutecznej opieki zdrowotnej i jest trwałym zagrożeniem ze strony chorób zakaźnych. Skuteczne leki przeciwko drobnoustrojom są konieczne zarówno jako środki zapobiegawcze, chroniące pacjentów z chorobami potencjalnie śmiertelnymi, jak i zapewniające, że standardowe procedury takie jak chirurgia ogólna czy chemioterapia znajdują się w grupie niskiego ryzyka. Obecnie nadużywanie tych środków w medycynie i produkcji żywności naraziło każdy kraj na ryzyko. Bez zharmonizowanych i natychmiastowych działań w skali globalnej, świat zmierza ku postantybiotkowej epoce, w której zwyczajne zakażenia ponownie mogą zabijać [1].

## 2. Rozwój bakterii lekoopornych

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe notuje się obecnie we wszystkich regionach świata. Jest to jedno z największych wyzwań dzisiejszej globalnej opieki zdrowotnej, a mimo to problem ten wciąż narasta. Antybiotykooporność to zdolność mikroorganizmu do adaptacji i wzrostu w obecności antybiotyku [3]. Najczęściej stosowane antybiotyki działają według określonych mechanizmów, które polegają na zaburzeniu syntezy ściany komórkowej (m.in. penicyliny, cefalosporyny, wankomycyny), blokowaniu procesu replikacji (kumaryny, chinolony) oraz hamowaniu biosyntezy białek (m.in. tetracykliny, erytromycyna, chloramfenikol, streptomycyny) [4]. Bakterie wypracowały cały szereg mechanizmów chroniących je przed działaniem antybiotyków. Należy tu wymienić przede wszystkim enzymatyczną inaktywację, zmniejszenie przepuszczalności ściany komórkowej, pompy wypompowujące antybiotyki z komórki oraz wytwarzanie enzymów modyfikujących cel działania lub sam antybiotyk. Najczęściej występującym rodzajem bakteryjnej oporności jest enzymatyczna inaktywacja leku (np.  $\beta$ -laktamazy wytwarzane m.in. przez *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Dotyczy ona antybiotyków, które zawierają w swojej strukturze pierścień  $\beta$ -laktamowy, czyli w głównej mierze penicylin, czy cefalosporyn. W wyniku udoskonalania i wprowadzania coraz to nowszych wersji antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, bakterie wytworzyły enzymy o większym spektrum substratowym, są to tak zwane ESBL (z ang. *extended spectrum  $\beta$ -lactamases*). Potrafią one całkowicie hydrolizować i inaktywować antybiotyki takie jak penicyliny, monobaktamy i cefalosporyny, z wyjątkiem karbapenemów i cefamycyn [5,6]. Drugim, równie istotnym mechanizmem lekooporności jest zmiana struktury receptora odpowiedzialnego za wiązanie antybiotyku. Mechanizm ten jest przyczyną powstawania metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA), a także opornych na ten lek gronkowców koagulazoujemnych (MRCNS). Istotą powstawania tego typu oporności związana jest z białkami PBP (z ang. *Penicillin Binding Proteins*), które odgrywają znaczącą rolę w strukturze bakteryjnej ściany komórkowej. Częste mutacje PBP w wyniku mutacji czy nadmiernej produkcji podlegają modyfikacjom, co znacznie zmniejsza ich powinowactwo do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych [5,7]. Kolejnym z mechanizmów oporności bakteryjnej jest aktywne usuwanie leków z komórek bakteryjnych poprzez pompy. Istotą tego mechanizmu są białka transportowe występujące w strukturze błony komórkowej, które zmniejszają wewnętrzne stężenie antybiotyku. Duży problem stanowią pompy oporności wielolekowej (MDRs, z ang. *Multi drug resistance pumps*) zdolne do usu-

wania różnych antybiotyków. Przykładowo *Pseudomonas aeruginosa* posiada zdolność wypompowywania z komórki m.in. sulfonamidów, tetracyklin,  $\beta$ -laktamów, makrolidów oraz fluorochinolonów [8]. Mikroorganizmy wykazują dwa rodzaje oporności: wrodzoną (charakterystyczną dla danego gatunku) oraz nabytą (charakterystyczną dla danego szczepu bakterii), która jest warunkowana różnymi mechanizmami [6]. Oporność naturalna może być związana z brakiem charakterystycznego miejsca docelowego dla danego leku, czy też posiadaniem struktur blokujących ich dostęp do wnętrza komórki. Nie jest ona wynikiem terapii i zwykle nie pociąga za sobą problemów medycznych. Znacznie większym problemem jest oporność nabyta bakterii, których genom podlega dziedzicznemu, a tym samym trwałym, zmianom. Mechanizm ten związany jest najczęściej z plazmidami oraz innymi ruchomymi elementami genetycznymi – transpozonomi [5,9]. Kluczowym mechanizmem powstawania i rozprzestrzeniania się lekooporności wśród bakterii jest horyzontalny transfer genów (HTG). Zjawisko to polega na przekazywaniu materiału genetycznego między komórkami bakteryjnymi na drodze koniugacji, transformacji lub transdukcji [2]. HTG jest często obserwowany w środowisku szpitalnym, gdzie pacjenci z obniżoną odpornością w łatwy sposób nabawiają się infekcji bakteryjnych. W przekazywaniu DNA pomiędzy mikroorganizmami udział mają także pracownicy szpitala, dlatego bardzo ważna jest prewencja i przestrzeganie zalecanych dawek przepisanych preparatów. Jednakże przykład coraz częstszej występowania szczepów MRSA wśród młodych ludzi, zarażonych podczas codziennych czynności, pokazuje, iż szerzenie się lekooporności nie ogranicza się jedynie do środowiska szpitalnego [7]. Szybki transfer genów między chorobotwórczymi bakteriami odpowiada za wzrost zachorowań oraz śmiertelności wśród ludzi na świecie. Zgodnie z Europejskim Centrum Prewencji i Kontroli Zakażeń, a także Europejską Agencją Leków (2009 rok) w wyniku infekcji lekoopornymi bakteriami, na terenie Unii Europejskiej, każdego roku umiera około 25 tysięcy osób [2].

## 3. Alternatywne metody zwalczania bakterii

### 3.1. Bakteriofagi

Jedną z alternatywnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych jest wykorzystanie bakteriofagów. Bakteriofagi to wirusy zdolne do specyficznego infekowania komórek bakterii i w przypadku cyklu litycznego prowadzące do zakłóceń i lizy komórki gospodarza, tym samym doprowadzając do śmierci bakterii [10]. Fagi izolowane są ze wszystkich środowisk w których występują bakterie. Licznie występują w wodach słodkich, oceanach oraz glebie. Szacunkowo na jedną komórkę bakteryjną przypada sto cząstek wirusowych [11]. Wyróżniamy fagi lityczne, które prowadzą do lizy komórki bakteryjnej wkrótce po jej rozpoznaniu oraz lizogeniczne, których genom wbudowuje się w postaci profaga do chromosomu bakteryjnego i pozostaje uśpiony, replikując się wraz z nim podczas każdego podziału komórki. Zmiana warunków środowiskowych może spowodować przejście w cykl lityczny, prowadząc tym samym do śmierci zainfekowanej komórki [12]. Początkowo uważano, że za aktywność przeciwbakteryjną odpowiadają wolne enzymy, jednak w 1915 roku Frederick Twort dowiódł istnienia wirusowych czynników infekujących bakterie, a Felix d'Herelle w 1917 nadał im nazwę bakteriofagi i jako pierwszy

zastosował je przeciwko czerwonce bakteryjnej. Od tego czasu prowadzono pod tym kątem wiele badań, odnosząc liczne sukcesy [13]. W Polsce terapię fagową po raz pierwszy zastosowano u ludzi w 1925 roku. W klinice Chirurgii Uniwersytetu Jagiellońskiego 40 pacjentom z gronkowcem podano odpowiednio przygotowane lizaty bakteriofagowe i wykazano ich skuteczność [14]. Po doustnym stosowaniu bakteriofagi mogą swobodnie przedostać się do krwi i innych tkanek. Wykazano, że fagi znajdujące się w krwiobiegu z łatwością penetrują do zainfekowanych tkanek, zdolne są także do pokonywania bariery krew-mózg. Ich transport może odbywać się również za pośrednictwem układu limfatycznego. Bakteriofagi produkują enzymy, które niszczą peptydoglikan ściany komórkowej ofiary, a do całkowitej aktywności i zakończenia lizy wymagają obecności holin [14,15]. Zespół z Wrocławia stosował fagoterapię do leczenia bakteryjnych schorzeń u ludzi wywołanych m.in. przez *Streptococcus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* i *Klebsiella*. Fagi podawano doustnie, pozajelitowo lub miejscowo zarówno osobom dorosłym, jak i dzieciom. Taką metodą leczono infekcje ropne, sepsy oraz różnego typu stany zapalne (jelit, żołądka, szpiku, skóry i płuc). Terapia z użyciem fagów przyniosła spodziewane efekty w niemal 90% przypadków i tylko u nielicznych wystąpiły skutki niepożądane w postaci alergii czy dolegliwości jelitowych [16]. W przeciągu ostatnich dwudziestu lat zainteresowanie fagami wzrosło. Z uwagi na stale rozwijające się zjawisko lekooporności jest to jedna z najbardziej obiecujących strategii terapeutycznych. Odnotowano, że oporność bakteryjna na fagi wydaje się być niższa w porównaniu do oporności wywołanej przez antybiotyki. Ponadto fagi posiadają dodatkowy atut w stosunku do powszechnie stosowanych antybiotyków (które są redukowane przez metabolizm i konieczne jest wielokrotne ich podawanie), mianowicie zwiększenie miana zależnie od różnych okresów eliminuje potrzebę powtarzania dawek. Wysoka specyfika względem konkretnych bakterii nie stanowi zagrożenia dla gospodarza, ponieważ fagi nie zaburzają pracy mikroflory jelit, co stanowi poważny efekt uboczny w przypadku antybiotykoterapii. Mimo, że fagi mogą być nośnikami czynników wirulencji lub „toksycznych” genów, pełna wiedza dotycząca sekwencji genomów fagowych może poszerzać możliwości terapeutyczne. Specyficzne i nietoksyczne fagi z wysokim indeksem terapeutycznym mogą być stosowane w celu zmniejszenia szans na rozwój patogenów oportunistycznych [12,17,18]

### 3.2. Hydrolazy ściany komórkowej bakterii (BCWH)

BCWH to enzymy degradujące bakteryjne peptydoglikan i prowadzące tym samym do lizy ich komórek [19]. Hydrolazy te możemy pozyskiwać z różnych źródeł: zwierzęta, owady, rośliny, bakterie oraz bakteriofagi. Mimo podobnej budowy, funkcje omawianych enzymów hydrolitycznych znacznie różnią się od siebie. Obecnie dzieli się je na lizozymy, autolizyny i virolizyny [20]. Lizozym to kationowe białko pochodzenia eukariotycznego. Jego bakteriobójcze właściwości zostały zaobserwowane już w 1922 roku przez Aleksandra Fleminga badającego wydzielinę nosową. Obecnie wiadomo, że lizozym występuje również we łzach, ślinie, krwi oraz w licznych tkankach komórek zwierzęcych. Najbardziej wydajnym źródłem tego enzymu jest jednak białko jaja kurzego. Mechanizm jego działania polega na hydrolizie wiązań glikozydowych mureiny, czego skutkiem jest zniszczenie ściany komórkowej, a wew-

nętrne ciśnienie komórki powoduje jej rozerwanie [21]. Lizozymy działają skutecznie głównie na bakterie gram-dodatnie, ale także na wirusy i grzyby. Muramidazy te wykorzystuje się przeważnie do ochrony i przetwarzania żywności, ale z powodzeniem mogą być stosowane również w weterynarii i medycynie [20]. Na tej samej zasadzie działają autolizyny, u których wykazano zdolność do odpowiedzi immunologicznej przeciwko bakteriom, w związku z czym mogą być wykorzystywane jako szczepionki. Virolizyny to czynniki antybakteryjne kodowane przez dsDNA fagi lityczne [14]. Wśród virolizyn znaczny potencjał wykazuje lizyna LysK, która została przebadana jako środek przeciwdrobnoustrojowy w zapobieganiu i leczeniu zakażeń powodowanych przez *Staphylococcus aureus*. Enzym ten wyizolowany z bakteriofaga K daje możliwość zwalczania szczepów MRSA stanowiących poważne zagrożenie środowiska szpitalnego [22]. Innym, skutecznym sposobem na walkę z chorobotwórczymi bakteriami jest lizyna PlyG, która wykazuje swoje lityczne właściwości zarówno wobec wegetatywnych komórek laseczek wąglika (*Bacillus anthracis*), jak i jego przetrwalników [23]. Lizyna PlyC wyizolowana z bakteriofaga C1, jest z kolei enzymem o dużej swoistości działającym jedynie na paciorkowce z grupy A (*Streptococcus pyogenes*). Lizyna ta już po 5 minutach ekspozycji jest zdolna do całkowitej eliminacji z próby *Streptococcus pyogenes* [24]. W badaniach wykazano, że niektóre virolizyny mogą być bardzo skutecznymi i bezpiecznymi środkami przeciwbakteryjnymi, ponadto działają szybko i to już w niskich dawkach [20]. Głównymi zaletami BCWH jest dobra skuteczność wobec bakterii antybiotykooopornych, ich wydajność, niskie koszty i szybkość działania. Wadą natomiast bardzo słabe oddziaływanie z bakteriami gram-ujemnymi, co wiąże się z inną budową ich ściany komórkowej [14].

### 3.3. Peptydy antybakteryjne (AMP)

AMP to krótkie peptydy pochodzenia naturalnego, które w większości nie posiadają więcej niż 100 reszt aminokwasowych. Ich aktywność wynika głównie z amfipatycznego charakteru i obecności cząsteczek o ładunku dodatnim. Pozwala im to wiązać się z błoną bakteryjną i wnikać w jej dwuwarstwową strukturę, co powoduje jej destabilizację. Ze względu na pochodzenie peptydy antybakteryjne dzielimy na eukariotyczne, bakteryjne i bakteriofagowe [12]. Pierwsze pogłoski dotyczące antybakteryjnego działania peptydów datowane są na lata sześćdziesiąte dwudziestego wieku i dotyczą bombininy pozyskanej ze skóry żaby *Bombina variegata*. Mimo przełomowego odkrycia, środek ten nie został zakwalifikowany do użytku terapeutycznego ze względu na hemolityczność. Wielkim sukcesem okazała się cekropia wyizolowana od ćmy *Hyalophora cecropia*, opisana przez Hansa Bomana w 1981 roku i charakteryzująca się szerokim spektrum zastosowania przeciwbakteryjnego. Innymi, wcześniej opisanymi peptydami antybakteryjnymi były także tachyplezyny pozyskane od krabów oraz magaininy syntetyzowane przez gady [25]. AMP pochodzenia eukariotycznego skupiają trzy grupy peptydów: trawienne, wiążące pierwiastki i przerywające błony bakteryjne. Pierwsze z nich występują głównie w ziarnistościach granulocytów i działają na patogeny w sposób naruszający ich strukturę komórkową. Zaliczamy do nich m.in. lizozymy i seprocydyny. Do peptydów wiążących pierwiastki zaliczamy laktoferynę działającą bakteriobójczo zarówno wobec bakterii gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych, hepcydynę i ikalprotektynę,

która działa dzięki zdolności przyłączania jonów cynku i wapnia. Peptydy przerywające błony bakteryjne to przede wszystkim szeroko poznane defensyny. Wykazano, iż wiążą się one z błoną bakteryjną i w wyniku wieloetapowego mechanizmu uruchamiają procesy prowadzące do apoptozy komórki. Poza defensynami dobrze poznane są katelicyny, które działają na podobnej zasadzie i również są peptydami o charakterze kationowym [26,27]. AMP pochodzenia bakteryjnego – bakteriocyny działają na błony bakteryjne, tworząc w nich pory. Zakońca to stabilność błony i prowadzi do całkowitego zahamowania procesów uprzednio utrzymujących komórkę przy życiu. Najbardziej znanymi bakteriocynami są produkowane przez bakterie gram-ujemne kolicyny. Poza tym, wyróżnia się także lantibiotyki, halocyny oraz bakteriocyny podobne do „ogonków” fagowych [27,28]. AMP pochodzenia bakteriofagowego do niszczenia bakterii wykorzystują najczęściej mechanizm virolizyna-holina. AMP cieszą się coraz większym zainteresowaniem badaczy ze względu na brak oporności bakteryjnej i niską toksyczność wobec komórek eukariotycznych [14].

### 3.4. Inhibitory lipopolisacharydów (LPS)

Lipopolisachydy (LPS) to endotoksyny cechujące bakterie gram-ujemne i odpowiedzialne za ich patogenność. LPS stanowi podstawowy składnik zewnętrznej błony komórki bakteryjnej i jest jej główną barierą fizyczną ograniczającą dostęp wielu substancjom, w tym także antybiotekom. Ponadto chroni błonę cytoplazmatyczną przed układem dopełniacza i komórkami fagocytarnymi [29]. Szerząca się w szpitalach wielolekooporność i leczenie infekcji wywoływanych przez niektóre bakterie gram-ujemne, posiadające błonę zewnętrzną, wymaga poszukiwania różnych nowych metod, które pokonałyby tę barierę. Pomocne wydają się wykorzystanie inhibitorów lipopolisacharydów [30]. Inhibitory te są związkami, które działają na zasadzie hamowania aktywności enzymów niezbędnych bakteriom do biosyntezy LPS, a zatem do prawidłowego wzrostu [31]. Przykładem może być PD 404182, który celuje w syntazę 8 biorącą udział w tworzeniu heteropolimeru błony zewnętrznej. Istotne znaczenie ma również inhibitor deacetylazy, która uczestniczy w syntezie lipidu A. Jego działanie udowodniono eliminując całkowicie bakterie *Escherichia coli* u eksperymentalnie zainfekowanych myszy [30]. Inhibitory lipopolisacharydów można podawać pacjentowi również podczas antybiotykoterapii i wspomagać antybiotyki, umożliwiając im pokonanie zewnętrznych osłon bakterii gram-ujemnych, co znacznie wspomaga proces leczenia [32].

### 3.5. Ingerencja w mechanizm *Quorum Sensing* (QS)

*Quorum sensing* (QS) jest systemem komunikacji bakterii, który pozwala kontrolować ich zachowania w odpowiedzi na gęstość populacji. Za komunikację odpowiedzialne są drobne cząsteczki sygnałowe, tak zwane autoinduktory, które pozwalają bakteriom monitorować ich objętość i kierować ekspresją genów [33]. Bakterie, które od lat uważane były za organizmy asocjalne i nie sądzono by w pojedynkę mogły wywierać jakikolwiek wpływ na środowisko zaskoczyły badaczy. Przypuszczenia dotyczące komunikacji bakterii zostały potwierdzone przez badania nad *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* w 1970 roku. Odkryto bowiem, iż bakterie te wytwarzają światło na zasadzie bioluminescencji tylko wtedy, gdy ich gęstość jest wystar-

czająco duża, a oddziałują na siebie poprzez wydzielanie chemicznych cząsteczek sygnałowych, które odbierają za pomocą powierzchniowych receptorów dopasowujących się do nich jak klucz do zamka, a następnie odpowiadają na nie skoordynowaną ekspresją specyficznych genów. W przypadku obserwowanych bakterii z rodzaju *Vibrio* są to geny odpowiadające za bioluminescencję, jednakże mechanizm *Quorum sensing* warunkuje również inne cechy, do których należą m.in. ekspresja czynników wirulencji, wytwarzanie antybiotyków i bakteriocyn, transfer genów, ruch pełzający, biokorozja, tworzenie biofilmów, czy sporulacja [34]. Bakterie mają charakterystyczny dla swojego gatunku system porozumiewania się i równoległe działający system międzygatunkowy. Wiadomo, że autoinduktory poszczególnych gatunków nieznacznie się między sobą różnią, natomiast cząsteczki biorące udział w komunikacji międzygatunkowej są identyczne [35]. Gram-ujemne bakterie jako autoinduktory wykorzystują acylowany lakton homoseryny (AHL), który ze względu na amfifilowy charakter swobodnie dyfunduje w poprzek bakteryjnej błony komórkowej. Z kolei gram-dodatnie bakterie komunikują się przy pomocy związków peptydowych (AIP) zawierających od 5 do 17 aminokwasów [36]. Fakt, iż mechanizm *Quorum sensing* indukuje rozwój licznych chorób staje się jeszcze bardziej niepokojący z uwagi na stale wzrastającą lekooporność. Praktyczne zastosowanie znalazły inhibitory oraz antagoniści systemu *Quorum sensing*, które mogą stanowić nowe leki przeciwdrobnoustrojowe. Interferencja z systemem odbywa się na drodze hamowania biosyntezy cząsteczek sygnałowych, ich enzymatycznej oraz chemicznej degradacji lub poprzez blokowanie ich receptora białkowego [34]. Doświadczenia nad nowym sposobem zwalczania bakterii w inhibicji regulatorów komunikacji bakterii wykorzystują m.in. naturalne i syntetyczne związki furanonu skuteczne wobec *Serratia liquefaciens*, *Salmonella typhimurium*, czy *Pseudomonas aeruginosa* [37,38]. Chemiczna degradacja autoinduktorów odbywa się poprzez alkaliczną hydrolizę AHL lub przez traktowanie silnymi, przeciwbakteryjnymi utleniaczami m.in. ozonem. Enzymatyczna degradacja cząsteczek sygnałowych została udowodniona dla laktonazy AHL wyizolowanej od laseczek z rodzaju *Bacillus* i acylazy AHL pochodzenia bakteryjnego oraz eukariotycznego [35,39]. Naukowcy ze Stanów Zjednoczonych również badali inhibitory systemu *Quorum sensing*. Za pomocą cząsteczki CAI-1, zahamowali komunikację między szczepami *Vibrio cholerae*. Równocześnie zablokowano także powstawanie biofilmu, który chroni te chorobotwórcze bakterie przed antybiotykami. Dzięki cząsteczkom CAI-1 lek mógł swobodnie dyfundować do wnętrza komórki i zahamować rozwój cholery, co znacznie poszerzyło możliwości terapeutyczne [40]. Hamowanie bakteryjnego systemu *Quorum sensing* wydaje się być obiecującym sposobem rozwiązania problemu lekooporności wśród bakterii. Metoda ta nie jest bezpośrednio zaangażowana w procesy istotne dla wzrostu bakterii, więc nie wywiera wpływu na rozwój ich oporności tak jak antybiotyki. Ponadto, związki upośledzające bakteryjną komunikację mogą być sukcesywnie łączone z tradycyjnymi antybiotykami w celu zwiększenia ich skuteczności [34].

### 3.6. Przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna (PACT)

PACT to terapia określana jako zależna od tlenu reakcja fotochemiczna zachodząca przy udziale światła. W reakcji pośredniczy związek fotouczulający powodujący powstawanie

cytotoksycznych, reaktywnych form tlenu, głównie tlenu singletowego [41]. Wykorzystanie światła jako terapii w medycynie i chirurgii jest monitorowane od czasów starożytnych do teraźniejszości. Zastosowanie terapii fotodynamicznej po raz pierwszy opisał duński lekarz Niels Finsen, który z powodzeniem wykazał, że światło ze skonstruowanej przez niego lampy łukowej (lampa Finsena) wykazuje leczniczy wpływ w leczeniu terytorialnego stanu zapalnego skóry znanego jako toczeń skóry. Koncepcję niszczenia komórek indukowaną interakcją światła ze związkami chemicznymi badał Osaar Raab (student medycyny pracujący z profesorem Hermanem von Trappeiner w Monachium), który odkrył, że kombinacja czerwieni akrydyny i światła ma śmiertelny wpływ na pierwotniaki. Znacznie później zespół Thomasa Dougherty sprawdził wpływ światła na podskórne guzy złośliwe, osiągając tym samym duży sukces kliniczny. Aktywne fotouczulacze używane w tych badaniach nazwano hematoporfirynami [42]. Do prawidłowego przebiegu procesu niezbędne są trzy zasadnicze elementy: fotouczulacz, tlen molekularny i źródło światła. Kombinacja tych składników pozwala na wyprodukowanie reaktywnych form tlenu i zniszczenie docelowej komórki [43]. Chociaż szczegółowy mechanizm PACT nie został dokładnie poznany, wiadomo, że występują dwa typy reakcji, które odgrywają tutaj kluczową rolę. I typ obejmuje transfer elektronów pomiędzy fotouczulaczem a związkami organicznymi (tłuszcze, białka) komórki. Reakcja prowadzi do powstawania wolnych rodników, które reagują z tlenem, generując tworzenie wysoce reaktywnych form tlenu takich jak nadtlenek wodoru, czy rodniki hydroksylowe wpływające na integralność błony komórkowej i jej nieodwracalne uszkodzenie. W reakcji typu II fotouczulacz znajdujący się w stanie trypletowym reaguje z tlenem w celu wytworzenia wysoce energetycznego tlenu singletowego, który może wchodzić w interakcje z licznymi substratami biologicznymi, wywołując tym samym oksydacyjne uszkodzenia zarówno ściany, jak i błony komórkowej. Tlen singletowy ma krótki czas i promień działania, przez co reakcja zachodzi w ograniczonej przestrzeni. Z tego powodu wydaje się więc idealnym rozwiązaniem dla konkretnie zlokalizowanych miejsc infekcji bez wpływu na oddalone komórki czy narządy. Przyjmuje się, że wytwarzanie tlenu singletowego odgrywa kluczową rolę w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciwko zakażeniom bakteryjnym, ale dowiedziono również, że jest skuteczne wobec innych chorób. Reaktywne formy tlenu działają wewnątrz komórki bakteryjnej lub w jej pobliżu, wywołując martwicę lub apoptozę komórek [42,44]. Fotosensybilizatory to naturalne bądź syntetyczne substancje przenoszące energię światła. Fotouczulacze, które mogą być wykorzystane w terapii powinny spełniać wiele wymogów m. in. być związkami chemicznymi o znanym, trwałym i czystym składzie, które są nietoksyczne przed aktywacją (w ciemności), hydrofilowe w celu łatwiejszej aplikacji oraz ich pasma absorpcji nie mogą pokrywać się z pasmami absorpcji barwników endogennych [45,46]. W terapii PACT jako fotouczulacze stosuje się głównie błękit metylenowy oraz błękit toluidynowy O. Aby aktywować związek, mechanizm terapii fotodynamicznej wymaga źródła światła o niskiej energii i określonej długości fali. Zarówno moc światła, jak i głębokość przenikania muszą być dostosowane zarówno do określonego zakażenia, jak i stosowanego fotouczulacza [42]. Skuteczność terapii fotodynamicznej testowano wielokrotnie z licznymi sukcesami. W swojej pracy Paulino wraz z wsp. przedstawia wpływ różu bengalskiego zastosowanego jako fotouczulacz na szczepy

*Streptococcus mutant* w warunkach laboratoryjnych i dowodzi zniszczenia wszystkich bakterii w próbce bez cytotoksycznego wpływu na komórki eukariotyczne [47]. Soukos i wsp. analizowali skuteczność terapii wobec biofilmów *Enterococcus faecalis* rozwijających się w wyekstrahowanych z zębów miękkich korzeniowych. Odpowiednio dobrane stężenie błękitu metylenowego w połączeniu z zastosowanymi promieniami świetlnymi doprowadziło do eliminacji 97% bakterii biofilmu, co dowodzi, iż terapia fotodynamiczna może posłużyć także jako zabieg wspomagający procedury zabijania bakterii pozostałych po standardowym leczeniu endodontycznym w systemach kanałowych [48]. Podejmowano także liczne próby zwalczania MRSA metodą PACT, co przyniosło wiele pozytywnych rezultatów w serii badań *in vitro*. Wilson i Pratten wykazali, że hodowlane szczepy MRSA ulegają znacznej inaktywacji pod wpływem sulfonowanej ftalocyjaniny glinu. Grupa innych badaczy opisała destrukcyjny wpływ wobec wymienionych bakterii przy użyciu porfirynowego fotouczulacza – XF73 [49]. Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna wskazana jest przede wszystkim do miejscowego leczenia powierzchni skóry oraz infekcji tkanek miękkich. To, w jakim stopniu nowe podejście zostanie wprowadzone w praktyce klinicznej, zależy przede wszystkim od farmakokinetyki, czyli idealnie opracowanego czasu inkubacji oraz naświetlania [41,50].

### 3.7. Substancje fitochemiczne

Rośliny współistniały z mikroorganizmami przez miliony lat i do tej pory radzą sobie z nimi doskonale. Powinniśmy zrozumieć, że powstawanie mikroorganizmów lekoopornych będzie trwało nadal, ale zmieniając naszą strategię i powracając do natury zjawisko to można zminimalizować [51]. W tradycyjnej medycynie rośliny były stosowane od czasów starożytnych do leczenia i zapobiegania przed chorobami zakaźnymi. W ostatnich latach stosowanie leków ziołowych i suplementów diety zawierających składniki roślinne uwydatniło się ze względu na wysoką zawartość substancji przeciwbakteryjnych [52]. Te cenne związki można pozyskiwać z nasion, liści, kwiatów, owoców oraz korzeni. Rośliny produkują szeroką gamę związków organicznych, a główną przyczyną ich sukcesu jest ich chemiczna różnorodność. [53]. Do związków o właściwościach przeciwbakteryjnych zaliczamy głównie fenole, chinony, flawony, flawonoidy i flawonole, taniny, kumaryny, terpenoidy, olejki eteryczne, lektyny, polipeptydy i alkaloidy. Zastosowanie ekstraktów roślinnych ma duże znaczenie terapeutyczne. Przykładowo ekstrakty z roślin takich jak cynamon, goździk, granat, czapetka kuminowa, tymianek czy lantana pospolita hamują wzrost wielolekoopornych *Pseudomonas aeruginosa*. Obiecujące wydaje się również wykorzystanie synergistycznego działania ekstraktów roślinnych w połączeniu z antybiotykami, co ma duży potencjał w zwalczaniu szczepów lekoopornych. Te synergistyczne kombinacje stanowią w dużej mierze niewykorzystane źródło nowych produktów farmaceutycznych o nowatorskich mechanizmach działania, które mogą przeciwdziałać oporności drobnoustrojów [54]. Chociaż większość antybiotyków pochodzi od mikroorganizmów glebowych lub grzybów, rośliny wyższe również były źródłem pierwotnych substancji przeciwbakteryjnych. Przykładem jest bakteriostatyczna i przeciwrzybiczna właściwość allicyny pozyskiwanej z czosnku [55]. Pomimo, iż allicyny zmiażdżonego czosnku uważane są za jedne z najsilniejszych, przeciwbakteryjnych fi-

toncydów, nie wykazują stabilności. Zastosowanie wyciągu na bazie wody stabilizuje cząsteczkę allicyny. Badania wykazały, że ekstrakty płynne allicyny były bardzo aktywne w stosunku do opornych izolatów klinicznych *Staphylococcus aureus*, w tym licznych szczepów MRSA [56]. Szacuje się, że surowce roślinne stanowią bazę dla około 50% leków produkowanych na zachodzie. Wiele spośród sprawdzonych medycznie, nowoczesnych leków początkowo było stosowane w postaci surowej w tradycyjnych praktykach ludowych. Główną korzyścią płynącą ze stosowania leków na bazie surowców roślinnych jest stosunkowe bezpieczeństwo w porównaniu z ich syntetycznymi alternatywami. Dodatkowo oferują one duże korzyści terapeutyczne i bardziej przystępne leczenie [55].

#### 4. Podsumowanie

Głównym problemem współczesnego społeczeństwa jest narastająca oporność mikroorganizmów na większość stosowanych obecnie leków przeciwdrobnoustrojowych. Adaptacja bakterii do konwencjonalnych metod leczenia wynika w głównej mierze z niewłaściwego użytkowania preparatów. Zbyt małe dawki antybiotyków, a także brak dyscypliny w ich stosowaniu, przyczyniają się dodatkowo do generowania mutacji genów bakteryjnych, a w konsekwencji do ich przenoszenia między bakteriami, nawet międzygatunkowo. Efekty niewłaściwego postępowania doprowadziły do powstania licznych mechanizmów obronnych uniemożliwiających niszczenie komórek bakterii przez dostępne leki. Obecnie spotykamy coraz więcej patogennych szczepów opornych na antybiotyki, które do tej pory dobrze sobie z nimi radziły. Doskonałym przykładem są metycylinooporne gronkowce *Staphylococcus aureus* (MRSA) stanowiące jedno z najpoważniejszych zagrożeń klinicznych. Z uwagi na to, że każdego roku notuje się coraz więcej szczepów mikroorganizmów wielolekoopornych, postanowiono skoncentrować się nad innymi możliwościami terapeutycznymi. Liczne prace dowodzą, że zarówno tradycja, jak i innowacyjne odkrycia pozwalają na eliminację nawet bardzo opornych szczepów. Być może, powracając do korzeni, odnajdziemy sposoby walki z bakteriami i powstrzymamy indukcję ich oporności. Związki przeciwbakteryjne pozyskiwane z natury to między innymi peptydy przeciwdrobnoustrojowe, hydrolazy ściany komórkowej bakterii, inhibitory systemu *Quorum sensing* oraz inhibitory lipopolisacharydów. Bardzo duży potencjał i udowodnione działanie wykazują również bakteriofagi i rośliny lecznicze stosowane z powodzeniem już od lat. Najważniejszym z punktu widzenia terapii i stosowania preparatów na bazie omawianych związków jest bezpieczeństwo i łatwość podania, wysoka aktywność przy jednoczesnym braku generowania oporności u zwalczanych mikroorganizmów i brak skutków ubocznych. Nie bez znaczenia jest również aspekt ekonomiczny i osiągnięcie wszystkich powyższych efektów przy stosunkowo niskich kosztach. W obliczu globalnego zagrożenia opracowanie coraz to nowszych metod zwalczania lekoopornych bakterii jest koniecznością. Nie należy jednak zapominać o profilaktyce, która wydaje się być nieodzowną pomocą znacznie ograniczającą ryzyko zakażenia.

#### Literatura

[1] WHO, *Global action plan on antimicrobial resistance*, World Health Organization, Geneva, 2015.

- [2] A. Zabłotni, A. Jaworski, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2014**, 64, 1040–1049. doi: 10.5604/17322693.1119027
- [3] WHO, *Worldwide country situation analysis: Response to antimicrobial resistance*, World Health Organization, Geneva, 2015.
- [4] D. Trojanowski, P. Skut, J. Hołówka, M.J. Szafran, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2014**, 68, 701–714. doi: 10.5604/17322693.1106890
- [5] E. Mazur, S. Klag, *Med. Rodz.*, **2004**, 6, 278–281.
- [6] E. Nikonorow, A. Baraniak, M. Gniadkowski, *Post. Mikrob.*, **2013**, 52, 261–271.
- [7] Ch.T. Walsh, M.A. Fishbach, *Świat Nauki*, **2009**, 8, 52–59.
- [8] A. Wasażnik, M. Grinholc, K.P. Bielawski, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2009**, 63, 123–133.
- [9] P. Szachta, M. Pazgrat, I. Ignyś, W. Cichy, *Gastroenterol. Pol.*, **2008**, 15, 251–254.
- [10] L. Endersen, J. O'Mahony, C. Hill, R.P. Ross, O. McAuliffe, A. Coffey, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **2014**, 5, 327–349. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092415
- [11] E. Brzozowska, J. Bazan, A. Gamian, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2011**, 65, 165–176. doi: 10.5604/17322693.936090
- [12] S.M. Mandal, A. Roy, A.K. Ghosh, T.K. Hazra, A. Basak, O.L. Franco, *Front. Pharmacol.*, **2014**, 5, 1–12. doi: 10.3389/fphar.2014.00105
- [13] K. Sandeep, *Curr. Sci.*, **2006**, 90, 631–633.
- [14] J. Śliwa-Dominiak, M. Witkowska, W. Deptuła, *Prz. Epidemiol.*, **2010**, 64, 399–403.
- [15] K. Dabrowska, K. Switala-Jelen, A. Opolski, B. Weber-Dabrowska, A. Gorski, *J. Appl. Microbiol.*, **2005**, 98, 7–13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x
- [16] R. Międzybrodzki, J. Borysowski, W. Fortuna, B. Weber-Dabrowska, A. Górski, *Kardiochir. Torakochir. Pol.*, **2006**, 3, 201–205.
- [17] J.M. Inal, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **2003**, 51, 237–244.
- [18] M. Skurnik, E. Strauch, *Int. J. Med. Microbiol.*, **2006**, 296, 5–14.
- [19] S. Gupte, M. Kaur, *J. Microbiol. Exp.*, **2016**, 3, 00086. doi: 10.15406/jmen.2016.03.00086
- [20] M. Kaur, S. Gupte, T. Kaur, *SMU M J*, **2016**, 3, 211–230.
- [21] E. Gajda, G. Bugla-Płoskońska, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2014**, 68, 1501–1515. doi: 10.5604/17322693.1133100
- [22] S. O'Flaherty, A. Coffey, W. Meaney, G.F. Fitzgerald, *J. Bacteriol.*, **2005**, 187, 7161–7164.
- [23] R. Schuch, D. Nelson, V.A. Fischetti, *Nature*, **2002**, 418, 884–889. doi: 10.1038/nature01026
- [24] J.S. Niczyporuk, M. Bartoszcze, *Prz. Epidemiol.*, **2007**, 61, 713–721.
- [25] W. Kamysz, *Nucl. Med. Rev.*, **2005**, 8, 78–86.
- [26] P. Niedźwiedzka-Rystwej, W. Deptuła, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2008**, 62, 524–529.
- [27] P. Niedźwiedzka-Rystwej, A. Mękal, W. Deptuła, *Alerg. Astma Immunol.*, **2010**, 15, 35–41.
- [28] D. Gwiazdowska, K. Trojanowska, *Biotechnologia*, **2005**, 1, 114–130.
- [29] J. Saluk-Juszczak, *Post. Biol. Komórki*, **2007**, 34, 159–172.
- [30] H. Marcy, A.F. Carol, *A method to assay inhibitors of lipopolysaccharide synthesis* [w:] *New antibiotic targets*, vol. 142, W.S. Champney (ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2008**, pp. 143–154. doi: 10.1007/978-1-59745-246-5\_12
- [31] S. Kozuma, Y. Hirota-Takahata, D. Fukuda, N. Kuraya, M. Nakajima, O. Ando, *J. Antibiot.*, **2014**, 67, 237–242. doi: 10.1038/ja.2013.121
- [32] C. Sansom, *Drug. Discov. Today*, **2001**, 6, 499–500. doi: 10.1016/S1359-6446(01)01804-9

- [33] C. Lixa, A. Mujo, C.D. Anobom, A.S. Pinheiro, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2015**, *149*, 1–15. doi: 10.1590/0001-3765201520140482
- [34] G. Bosgelmez-Tinaz, *J. Marmara Univ. Inst. Health Sci.*, **2013**, *3*, 159–163. doi: 10.5455/musbed.20130910085643
- [35] K. Myszka, K. Czaczyk, *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2010**, *64*, 582–589.
- [36] E. Gospodarek, P. Zalas, *Post. Mikrob.*, **2008**, *47*, 365–370.
- [37] M. Manefield, L. Harris, S.A. Rice, R. de Nys, S. Kjelleberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, *66*, 2079–2084. doi: 10.1128/AEM.66.5.2079-2084.2000
- [38] T. Defoirdt, W. Verstraete, P. Bossier, *J. Appl. Microbiol.*, **2008**, *104*, 1480–1487. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03672.x
- [39] B.A. Annous, P.M. Fratamico, J.L. Smith, *J. Food Sci.*, **2009**, *74*, 24–37. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.01022.x
- [40] R.C. Kelly, M.E. Bolitho, D.A. Higgins, W. Lu, W.L. Ng, P.D. Jeffrey, J.D. Rabinowitz, M.F. Semmelhack, F.M. Hughson, B.L. Bassler, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 891–895. doi: 10.1038/nchembio.237
- [41] F.F. Sperandio, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, **2013**, *8*, 108–120.
- [42] S. Rajesh, E. Koshi, K. Philip, A. Mohan, *J. Indian Soc. Periodontol.*, **2011**, *15*, 323–327. doi: 10.4103/0972-124X.92563
- [43] J.P.M.L. Rolim, M.A.S. de-Melo, S.F. Guedes, F.B. Albuquerque-Filho, J.R. de Suoza, N.A.P. Nogueiea, I.C.J. Zanin, L.K.A. Rodrigues, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2012**, *106*, 40–46. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001
- [44] X.J. Fu, Y. Fang, M. Yao, *BioMed. Res. Int.*, **2013**, *2013*, 159157. doi: 10.1155/2013/159157
- [45] R.R. Allison, K. Moghissi, *Clin. Endosc.*, **2013**, *46*, 24–29. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24
- [46] A. Nowak-Stępniewska, P. Pergoń, A. Padzik-Graczyk, *Post. Bioch.*, **2013**, *59*, 53–63.
- [47] T.P. Paulino, K.F. Ribeiro, G. Thedei, A.C. Tedesco, P. Ciancaglini, *Arch. Oral Biol.*, **2005**, *50*, 353–359. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.09.002
- [48] N.S. Soukos, P.S. Chen, J.T. Morris, K. Ruggiero, A.D. Abernethy, S. Som, F. Foschi, S. Doucette, L.L. Bamman, C.R. Fontana, A.G. Doukas, P.S. Stashenko, *J. Endodont.*, **2006**, *32*, 979–984. doi: 10.1016/j.joen.2006.04.007
- [49] T. Maisch, C. Bosl, R.M. Szeimies, B. Love, C. Abels, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, *6*, 545–551. doi: 10.1039/B614770D
- [50] T. Maisch, S. Hackbarth, J. Regensburger, A. Felgenträger, W. Baumler, M. Landthaler, B. Roder, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, **2011**, *9*, 360–366. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x
- [51] E.M. Abdallah, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2011**, *1*, 16–20.
- [52] S.M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia, S.F. Nabavi, *Food Chem.*, **2015**, *173*, 339–347. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.042
- [53] E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas, P. Florou-Paneri, *Agriculture*, **2012**, *2*, 228–243. doi: 10.3390/agriculture2030228
- [54] A.K. Pandey, S. Kumar, *Pharmacologia*, **2013**, *4*, 469–480. doi: 10.5567/pharmacologia.2013.469.480
- [55] I.D. Ciocan, I.I. Bara, *Genet. Mol. Biol.*, **2007**, *8*, 151–56.
- [56] R.R. Cutler, P. Wilson, *Br. J. Biomed. Sci.*, **2004**, *61*, 71–74.