

BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI MONENZYNY A

Joanna Stefańska^{*1}, Adam Huczyński²

¹Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

*autorka korespondująca: tel. 4822 628 0822; e-mail: joannastefanska@wum.edu.pl

²Zakład Biochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

e-mail: adhucz@amu.edu.pl

Otrzymano 16.06.2008; zaakceptowany 28.07.2008; zamieszczony 5.08.2008

STRESZCZENIE

Jonofory polieteryowe należą do dużej grupy naturalnych, aktywnych biologicznie substancji wytwarzanych przez promieniowce. Są to związki zdolne do transportowania kationów przez błony lipidowe komórek. Monenzyna A, antybiotyk jonoforowy, izolowany ze szczepów *Streptomyces cinnamonensis*, jest szeroko stosowana jako stymulator wzrostu w weterynarii. Monenzyna i jej pochodne wykazują działanie przeciwpierwotniakowe (wobec pierwotniaków z grupy *Coccidium* i zarodźców malarii) oraz przeciwdrobnoustrojowe.

SŁOWA KLUCZOWE: antybiotyki jonoforowe, monenzyna A, kompleksowanie kationów metali, aktywność biologiczna

ABSTRACT

BIOLOGICAL PROPERTIES OF MONENSIN A

The polyether ionophores represent a large group of natural, biologically active substances produced by *Streptomyces*. The compounds are lipid-soluble and are able to transport cations across cell membranes. Monensin A, ionophore antibiotic isolated from *Streptomyces cinnamonensis* is widely used as a growth promoter in veterinary. Monensin and its derivatives showed anticoccidial, antimalarial and antimicrobial activity.

KEY WORDS: ionophore antibiotics, Monensin A, metal cations complexes, biological activity

1. Antybiotyki jonoforowe

W 1964 roku Pressman i współpracownicy [1] opisali nową klasę antybiotyków, które indukują transport jonów metali alkalicznych przez błony mitochondriów. Antybiotyki te są nośnikami jonów (tzw. jonoforami), zdolnymi do kompleksowania kationów i przenoszenia ich z roztworów wodnych przez barierę lipidową błon biologicznych.

Chociaż od odkrycia jonoforów minęło już ponad 40 lat, to do chwili obecnej nie ma jednolitego systemu klasyfikacji tej grupy związków chemicznych. Badacze dzielą je uwzględniając różne kryteria: mechanizm transportu (neutralne, karboksylowe, pseudojonofory); budowę - naturalne cykliczne (walinomycyna, enniatyny, naktyny) i naturalne niecykliczne jonofory (grupa nigerycyny) [2, 3]. Według jeszcze innego systemu naturalne jonofory przenośnikowe dzieli się na: jonofory neutralne (walinomycyna, enniatyny, naktyny), peptydy cykliczne (antamanid), jonofory karboksylowe (jonofory z grupy nigerycyny, jonofory kationów dwuwartościowych i inne) [4].

Najprościej jonofory można podzielić na jonofory syntetyczne oraz naturalne. W grupie naturalnych można wyróżnić jonofory typu przenośnikowego oraz jonofory tworzące kanały. Do jonoforów przenośnikowych zalicza się cykliczne jonofory neutralne oraz niecykliczne jonofory karboksylowe. Uwzględniając rodzaj występujących w nich

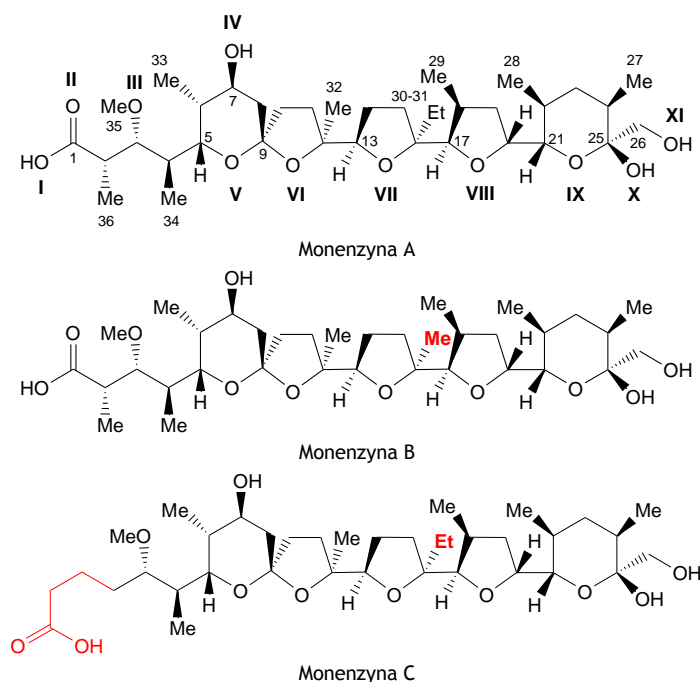
wiązań, jonofory cykliczne można podzielić na: cyklopeptydy zbudowane wyłącznie z aminokwasów (np. antamanid), cyklodepsydy zbudowane tylko z hydroksykwasów (np. nonaktyna) oraz cyklodepsiptydy zbudowane z połączonych na przemian aminokwasów i hydroksykwasów (np. walinomycyna, enniatyna, buwerycyna). Z kolei w grupie niecyklicznych jonoforów karboksylowych wyróżnić można jonofory kompleksujące kationy jednowartościowe (np. nigerycyna, monenzyna) oraz kompleksujące kationy dwuwartościowe (np. jonomycyna, kwas lasalowy) [5].

2. Struktura monenzyny i jej kompleksów

Monenzyna należy do grupy karboksylowych jonoforów polieteryowych kompleksujących jednowartościowe kationy metali. Związki należące do tej grupy mają zbliżoną budowę, większość z nich występuje w formie cyklicznej i posiada podstawowy szkielet, którego budowa przypomina szkielet monenzyny i do którego dołączone mogą być różne pierścienie.

Wyizolowano 3 homologii monenzyny (Ryc. 1), różniące się między sobą liczbą grup metylowych. Najczęściej występującą formą jest monenzyna A.

Monenzyna A wykazuje zdolność do kompleksowania kationów metali jednowartościowych przez tworzenie cyklicznej formy kompleksu (Ryc. 2), który dodatkowo jest



Ryc. 1. Struktura homologów monenzyny.

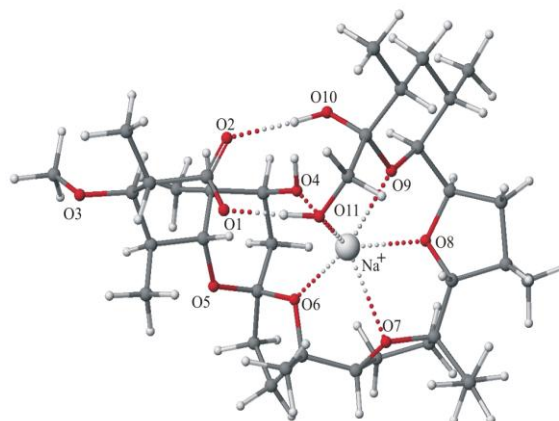
stabilizowany wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy zdeprotonowaną grupą karboksylową a grupami hydroksylowymi.

Ponieważ monenzyna ma 10-krotnie większe powinowactwo do jonów sodu niż potasu, w komórkach pośredniczy przede wszystkim w wymianie Na^+/H^+ . Podobnie jak inne karboksylowe antybiotyki jonoforowe, kompleksuje ona kation metalu w hydrofilowej wnęce, izolując go od środowiska zewnętrznego i umożliwia przenoszenie go z jednego środowiska wodnego do drugiego poprzez błony lipidowe, które stanowią naturalną barierę przepuszczalności dla związków jonowych. Kompleks taki jest elektrycznie obojętny i rozpuszczalny w hydrofobowych rozpuszczalnikach, dzięki czemu łatwo pokonuje barierę lipidową. W jedną stronę przez błonę biologiczną transportowany jest elektrycznie obojętny kompleks anionu monenzyny z kationem metalu. Po drugiej stronie warstwy lipidowej kation metalu jest uwalniany, antybiotyk wychwytuje proton i jako cząsteczka bez ładunku jest transportowany w kierunku odwrotnym, na zewnątrz komórki. Proton zostaje oddysocjowany i monenzyna może kompleksować kolejny kation [5].

3. Otrzymywanie monenzyny

Po raz pierwszy monenzynę wyizolowano w 1967 roku. Spośród kilku homologów najszerzej stosowana jest monenzyna A, zwykle w postaci soli sodowej (Ryc. 2).

Obecnie proces biotechnologiczny obejmuje biosyntezę i wydzielanie soli sodowej monenzyny A w hodowli promieniowców *Streptomyces cinnamomensis* prowadzonej w podłożu kompleksowym, zawierającym glukozę, grys i olej sojowy, oleinian metylu i dodatek soli mineralnych. W celu neutralizacji powstających kwasów dodaje się kredę. Hodowlę prowadzi się około tygodnia w temperaturze 30°C z intensywnym napowietrzaniem [7, 8, 9].



Ryc. 2. Struktura kompleksu soli sodowej monenzyny A (wg [6]).

Biosynteza monenzyny, podobnie jak i innych antybiotyków polieteryowych zachodzi na szlaku poliketydowym, podobnym do przemian biochemicznych zachodzących w procesie biosyntezy kwasów tłuszczowych. Prekursorami są propionilo-CoA i malonylo-CoA, które dostarczają jednostek octanowych, propionianowych i maślanowych. Cząsteczka monenzyny zawiera siedem reszt propionianowych, pięć octanowych i jedną resztę kwasu maślanowego.

W procesie biosyntezy zachodzą procesy:

- wiązanie reszt acylowych,
- reakcja kondensacji kolejnej cząsteczki malonylo-CoA z uwolnieniem CO_2 ,
- redukcja grupy ketonowej,
- wydzielenie cząsteczki wody,
- redukcja podwójnego wiązania.

W biosyntezie z udziałem acetylo-CoA i malonylo-CoA uczestniczy wieloenzymatyczny kompleks, w którym ważną rolę pełni białko nośnikowe reszt acylowych. Informacje na

temat biosyntezy monenzyny uzyskano dzięki badaniom z zastosowaniem cząsteczek znakowanych izotopami ^{18}O i ^{13}C [7].

Produkt biosyntezy wydzielany jest na zewnątrz z komórek promieniowców i zwykle jego stężenie w hodowli jest rzędu kilku gramów na litr. Po tygodniowym okresie biosyntezy, z hodowli odsącza się składniki stałe, zakwasza do pH 3 i dalej prowadzi ekstrakcję chloroformem. Następnie ekstrakt oczyszcza się węglem aktywowanym i zatęża. Suchą pozostałość poddaje się rekrytalizacji w celu dokładniejszego oczyszczenia. Jeżeli stężenie monenzyny w samym produkcie biosyntezy jest większe, rzędu 10 g/l, dokonuje się bezpośredniej ekstrakcji z zawiesiny pohodowlanej za pomocą *n*-heksanolu, następnie oddestylowuje się wodę metodą azeotropową. Produkt wydzielany z fazy organicznej przez zatężenie i oczyszcza przez krystalizację [7].

4. Właściwości monenzyny

W Tabeli 1 przedstawiono krótką charakterystyką monenzyny oraz pokazano toksyczność tego związku dla zwierząt. Monenzyna od chwili odkrycia jest obiektem zainteresowania naukowców ze względu na swoje właściwości biologiczne i farmakologiczne. Znaczna część prac poświęcona jest mechanizmowi jej działania i zastosowaniu w weterynarii.

Monenzyna wykazuje bardzo różnorodną aktywność biologiczną. Najwcześniej wykryto efekty komórkowe w postaci działania na aparat Golgiego zarówno w komórkach roślin jak i zwierząt. Monenzyna jest inhibitorem rozrostu wybranych komórek, ponieważ blokuje wewnątrzkomórkowy transport białek na poziomie aparatu Golgiego, bez wyraźnego hamowania syntezy tych białek. Również transfer produktów wytworzonych w strukturach Golgiego jest hamowany przez monenzynę [10, 11]. Pod wpływem dzia-

łania monenzyny kultury komórek roślinnych spowalniają swój wzrost lub hamowane są wybrane procesy komórkowe i zwykle dochodzi do zmian w funkcjonowaniu i strukturze aparatu Golgiego. Natomiast w komórkach zwierząt pod wpływem monenzyny dochodzi do uszkodzenia mitochondriów bez wyraźnych modyfikacji w działaniu struktur Golgiego [12].

Monenzyna może również spowalniać i osłabiać procesy endocytozy, czyli transportu dużych cząsteczek przez błonę komórkową przy udziale przenośników białkowych [13, 14]. Antybiotyk powoduje zmianę pH wewnątrz struktur komórkowych, co może prowadzić do zmniejszenia wydzielania i/lub transportu ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki związków chemicznych.

Monenzyna wpływa również na procesy tworzenia zewnętrznych struktur na powierzchni komórek oraz ich wzrost, poprzez zmniejszenie wydzielania substancji odpowiedzialnych za te procesy (proteoglikanów, kolagenu, fibronektyny) [12]. Komórkowe efekty działania monenzyny zależą od rodzaju organizmu poddanego jej działaniu, drogi podania antybiotyku i jego dawki. Najważniejsze efekty komórkowe wywoływane przez monenzynę przedstawiono w Tabeli 2.

W nielicznych badaniach nad aktywnością przeciwnowotworową monenzyny wykazano, że może ona hamować proliferację komórek raka nerkowokomórkowego przez indukcję apoptozy w komórkach rakowych i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 lub G2-M [15].

5. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe monenzyny

Monenzyna jest jednym z najczęściej badanych antybiotyków jonoforowych. Większość prac poświęcona jest jej aktywności biologicznej, w tym także działaniu przeciwdrobnoustrojowemu.

Tabela 1. Krótka charakterystyka monenzyny A (wg [5]).

Nazwa polska / Nazwa angielska (INN)	Monenzyna A, kwas monenzynowy / Monensin A
Nazwa wg CAS (Chemical Abstracts Service)	2-[5-Ethyltetrahydro-5-[tetrahydro-3-methyl-5-[tetrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl]-2-furyl]-9-hydroxy-8-methoxy- α,β ,2,8-tetramethyl-1,6-dioxaspiro[4.5]decane-7-butyric acid
Masa cząsteczkowa	670.87
Wzór sumaryczny	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$
Rok i źródło izolacji	1967, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>
Skład procentowy	C 64,45%; H 9,32%; O 26,23%
Temperatura topnienia	103-105 °C (monohydrat)
Skręcalność właściwa	$[\alpha]_D = +47,7^\circ$ (metanol)
Rozpuszczalność	słabo w wodzie, dobrze w węglowodorach i rozpuszczalnikach organicznych
Toksyczność dla zwierząt (podanie doustne w postaci soli sodowej) LD ₅₀	
Małpa	>160 mg/kg
Kurczak	145 mg/kg
Królik	42 mg/kg
Szczur	29 mg/kg
Bydło	26 mg/kg
Świnia	17 mg/kg
Pies	> 10 mg/kg

Tabela 2. Wybrane efekty komórkowe działania monenzyny (wg [12]).

Zmniejszenie wydzielania: proteoglikanów, proteolaktyny, albuminy, transferryny, polipeptydów proinsulinowych, izoenzymu α -amylazy, globulin wiążących tyroksynę, globulin wiążących gonadotropinę, acetylo-cholinoesterazy, fitohemaglutyniny, lipoprotein VLD, glikoprotein wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej
Zwiększenie wydzielania: amin biogennych typu katecholamin, enzymu kaskady proteolitycznej - katepsyny D
Upośledzenie procesów przemian białek: np. zmiany proalbuminy w albuminę
Dekompletacja tworzenia oligosacharydów: glikoprotein wirusa opryszczki pospolitej, koronawirusów, mieloperoksydazy, fibronektyny
Hamowanie przyswajania: arylosulfatazy, immunoglobuliny, α -2-makroglobuliny, peroksydazy chrzanowej
Hamowanie dysocjacji przyswojonych ligandów: asialoglikoproteiny, asialoorosomukoidu
Hamowanie transferu ligandów: czynników wzrostu epidermy, B-haksaminidazy, lipoprotein o niskiej gęstości, immunoglobulin, proteoglikanów do lizosomów
Hamowanie zakwaszania: endosomów, egzosomów oraz lizosomów
Wpływ na procesy tworzenia zewnętrznych struktur komórkowych poprzez zmniejszenie wydzielania: proteoglikanów, kolagenu i prokolagenu, fibronektyny, lamininy

Działanie przeciwbakteryjne monenzyny może być tłumaczone zmianami pH i równowagi sodowo-potasowej w komórce, co prowadzi do zaburzeń istotnych procesów komórkowych i w efekcie do śmierci komórki [16]. Wykazano aktywność monenzyny i niektórych jej pochodnych wobec bakterii Gram-dodatnich z rodzajów *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* [17, 18, 19]. Okazało się, że jedynie bakterie Gram-dodatnie odznaczają się wrażliwością na monenzynę, co może wynikać z faktu, że ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych ma bardziej złożoną budowę, przez co nie jest przepuszczalna dla dużej cząsteczki antybiotyku oraz tworzonych przez nią kompleksów.

Z prac poświęconych badaniom nad właściwościami przeciwwirusowymi monenzyny wynika, że jest ona aktywna wobec niektórych wirusów. Wykazano np. hamowanie procesów replikacji wirusów pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej i wirusa Sindbis [20, 21]. W innych badaniach stwierdzono, że monenzyna hamuje penetrację wirusa Semliki Forest do komórek docelowych [14]. Iacangelo i współpracownicy [22] w swoich badaniach wykazali, że monenzyna powoduje zmniejszenie syntezy DNA i skutecznie hamuje replikację oraz wywołuje zdecydowane zmniejszenie ilości powstających wczesnych antygenów wirusowych mysiego wirusa polyoma.

Monenzyna w badaniach "in vitro" wykazywała wyraźną aktywność wobec zarodźców malarii *Plasmodium falciparum*, znacznie silniejszą, niż lek przeciwmalaryczny - chlorochina. W badaniach "in vivo" na myszach zakażonych *Plasmodium vinckei petteri* uzyskano wyleczenie 100% zwierząt po zastosowaniu dawki monenzyny 10 mg/kg. Działanie przeciwmalaryczne monenzyny można tłumaczyć zaburzeniami funkcji wakuoli odżywczej i innych organelli pasożyta oraz zakwaszeniem środowiska wewnątrzkomórkowego, które w efekcie prowadzi do jego śmierci [23].

6. Pochodne monenzyny i ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa

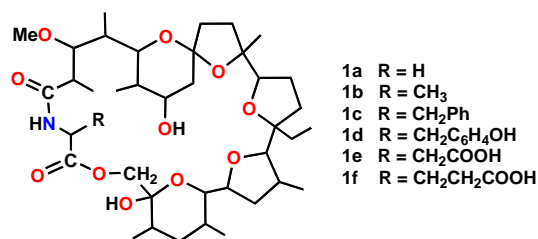
Szerokie spektrum właściwości przeciwdrobnoustrojowych i biologicznych monenzyny sprawia, iż niezwykle interesującym kierunkiem badawczym jest chemiczna

modyfikacja monenzyny. Nowe pochodne tego jonoforu, w zależności od miejsca modyfikacji chemicznej, różnią się od macierzystej cząsteczki: selektywnością kompleksowania kationów, strukturą powstałych kompleksów, mechanizmem transportu jonów, toksycznością i właściwościami biologicznymi, w tym aktywnością przeciwdrobnoustrojową.

W kilku grupach badawczych, w większości japońskich i amerykańskich, a ostatnio również w zespole polskim, zsyntezowano kilkanaście pochodnych monenzyny, z których część przebadano pod względem aktywności mikrobiologicznej.

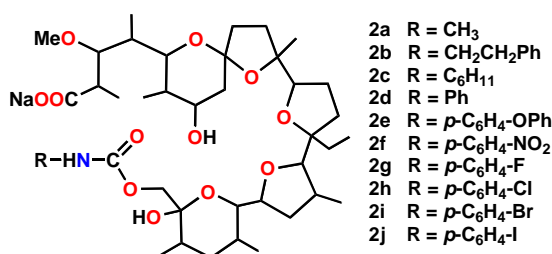
Wśród otrzymanych pochodnych monenzyny były między innymi makrocycliczne laktony (Ryc. 3 - związki 1a-f), w których grupa karboksylowa monenzyny połączona jest z grupą $O_{X}H$ poprzez łącznik, którego rolę pełni odpowiedni naturalny aminokwas. Pochodne te testowano na ich aktywność przeciw bakteriom beztlenowym i wykazały one niższą aktywność przeciw tym drobnoustrojom od niemodyfikowanej monenzyny A. Dla przykładu wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost szczepu *Peptostreptococcus anaerobius* B-30 dla związków 1a-f wynosiły od 25 do ponad 50 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy MIC dla monenzyny wynosiło 1,56 $\mu\text{g/ml}$ [24].

Kolejną grupę pochodnych monenzyny stanowią związki, w których modyfikacji chemicznej poddano jedną z dwóch grup hydroksylowych tego antybiotyku: grupę $O_{IV}H$ bądź $O_{XI}H$.



Ryc. 3. Struktura makrocyclicznych laktonów monenzyny A (wg [24]).

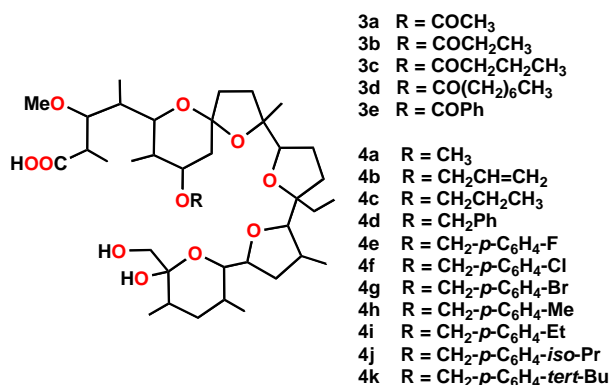
Westley i współpracownicy [25] opisali syntezę i właściwości przeciwdrobnoustrojowe serii uretanów monenzyny, otrzymanych w wyniku modyfikacji grupy $O_{11}H$ (Ryc. 4 - związki 2a-j). Pochodne te okazały się niezwykle interesujące pod względem właściwości chemicznych i mikrobiologicznych, gdyż zdolne są transportować kationy jednowartościowe około 10 razy efektywniej niż monenzyna. Pochodne te wykazywały także nawet 10-krotnie wyższą aktywność w porównaniu z niemodyfikowaną monenzyną wobec bakterii Gram-dodatnich (wartości MIC dla uretanów wynosiły od 0,02 do ponad 25 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto niektóre z tych związków były aktywne również przeciw grzybom *Candida albicans* (MIC dla uretanów od 0,08 $\mu\text{g/ml}$ do ponad 100 $\mu\text{g/ml}$, a dla niemodyfikowanej monenzyny MIC >100 $\mu\text{g/ml}$) i *Penicillium digitatum* (MIC dla uretanów od 6,3 $\mu\text{g/ml}$ do ponad 100 $\mu\text{g/ml}$, dla niemodyfikowanej monenzyny MIC >100 $\mu\text{g/ml}$). Cztery z otrzymanych uretanów monenzyny wykazywały także w testach *in vivo* właściwości przeciwmalaryczne [25].



Ryc. 4. Struktura wybranych uretanów monenzyny A [wg 25].

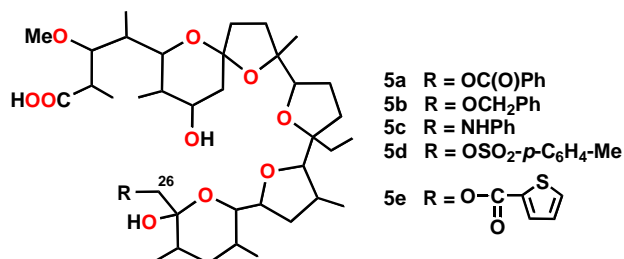
Wśród pochodnych monenzyny ze zmodyfikowaną grupą hydroksylową $O_{11}H$ znalazły się jej pochodne estrowe (Ryc. 5 - związki 3a-e), oraz pochodne eterowe (Ryc. 5 - związki 4a-k) [26, 27]. Acylowe pochodne monenzyny (Ryc. 5 - związki 3a-e) wykazywały niższą od związku wyjściowego aktywność przeciwbakteryjną, zarówno wobec bakterii tlenowych jak i beztlenowych. Natomiast etery benzytowe monenzyny (Ryc. 5 - związki 4d-k) cechowała niewiele lepsza od monenzyny aktywność przeciwbakteryjna, co może być związane z hydrofobowym charakterem podstawnika benzyłowego, którego rola polega na polepszaniu rozpuszczalności pochodnych monenzyny w błonie komórkowej bakterii [27].

Przeprowadzono również modyfikację chemiczną monenzyny przy atomie węgla C-26, w wyniku tego otrzymano różne pochodne tego antybiotyku obejmujące: estry, etery, aminy i sulfoniany (Ryc. 6 - związki 5a-e). Wśród tych pochodnych monenzyny wyróżniającą się aktywność przeciwbakteryjną wykazywała 26-fenylaminomonenzyna (związek 5c), dla której wartości MIC wobec różnych szczepów bakteryjnych wynosiły 0,2-6,25 $\mu\text{g/ml}$. Aktywność tej pochodnej była wyższa od monenzyny a nawet od bardzo aktywnej pochodnej 26-fenylouretanu monenzyny (związek 2c) [28].



Ryc. 5. Pochodne monenzyny ze zmodyfikowaną grupą hydroksylową $O_{11}H$ (wg [26, 27]).

Modyfikacja chemiczna monenzyny w pozycji C-26 może prowadzić również do zmiany preferencji kompleksowania przez ten jonofor. Badania Rochdi i współpracowników [29] udowodniły, iż w przypadku pochodnych monenzyny 5d i 5e efektywność transportu kationów potasu przez błony wzrosła, a kationów sodu zmalała, tak iż pochodne te preferencyjnie kompleksują i transportują kationy potasu, przed kationami sodu.



Ryc. 6. Pochodne monenzyny z modyfikacją chemiczną przy atomie węgla C-26 (wg [28, 29]).

Taka inwersja selektywności kompleksowania kationów metali przez monenzynę w wyniku jej modyfikacji chemicznej doprowadziła również do polepszenia jej właściwości przeciwbakteryjnych wobec *Bacillus cereus* oraz aktywności przeciwmalarycznej *in vitro* wobec zarodźca malarii *Plasmodium falciparum* [29].

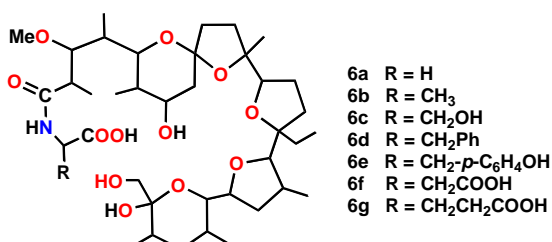
Ostatnią grupę pochodnych monenzyny stanowią związki, w których przekształceniu chemicznemu poddano grupę karboksylową tego jonoforu (Ryc. 7-9). Otrzymane amidy monenzyny z różnymi naturalnymi aminokwasami (Ryc. 7- związki 6a-g) okazały się być nieaktywne mikrobiologicznie [30].

W ostatnich latach w grupie prof. Brzezińskiego [5, 19] zsyntezowano serię estrów monenzyny (Ryc. 8-9), które poddano badaniom aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej użyto szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich, pałeczek Gram-ujemnych oraz drożdżaków z rodzaju *Candida* (Tabela 3).

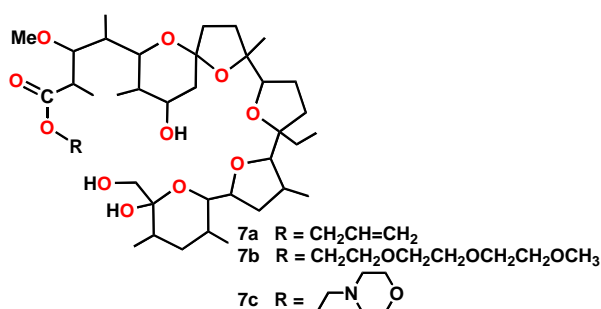
Tabela 3. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC, µg/ml) wzrost drobnoustrojów testowych dla monenzyny A i jej estrów 7a-c (wg [19]).

	(Monenzyna A) MIC	(7a) MIC	(7b) MIC	(7c) MIC
<i>S. aureus</i> NCTC 4163	2	100	100	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	100	50	6,25
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2	100	100	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	100	50	6,25
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2	100	100	12,5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1	12,5	25	6,25
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	2	12,5	50	6,25
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	12,5	>400	>400	50
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	4	100	200	25
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	2	50	50	12,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	na	na	na	200
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	na	na	na	200
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	na	na	na	400

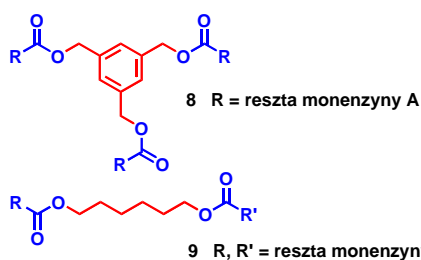
na - brak aktywności (*no activity*) przeciwdrobnoustrojowej w teście przeprowadzanym metodą krążko-wo-dyfuzyjną



Ryc. 7. Pochodne monenzyny ze zmodyfikowaną grupą karboksylową - amidy monenzyny z naturalnymi aminokwasami (wg [30]).



Ryc. 8. Pochodne monenzyny ze zmodyfikowaną grupą karboksylową - estry monenzyny [19].



Ryc. 9. Wielkocząsteczkowe pochodne monenzyny ze zmodyfikowaną grupą karboksylową (wg [31]).

Monenzyna A i jej estry, które wykazywały aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich zostały poddane dodatkowym testom na szpitalnych szczepach *S. aureus*, w tym na szczepach metycylinowrażliwych (MSSA) oraz metycylinoopornych (MRSA). W badaniach tych wykazano, iż monenzyna oraz ester 2-morfolinoetylowy (7c) posiadały wysoką aktywność zarówno przeciw szczepom gronkowców złocistych MSSA jak i MRSA (monenzyna: MIC od 1 do 8 µg/ml; ester 2-morfolinoetylowy monenzyny (7c): MIC od 6,25 do 25 µg/ml). Estry 7a i 7b cechowała umiarkowana aktywność przeciw tym drobnoustrojom [19].

W grupie prof. Brzezińskiego opracowano również syntezę wielkocząsteczkowych pochodnych monenzyny (dimerów i trimerów monenzyny, Ryc. 9). Pochodne te są całkowicie nieaktywne wobec bakterii Gram-ujemnych, gdyż związki o tak dużych masach cząsteczkowych nie są w stanie wnikać w rozbudowaną błonę tych bakterii. Związki te natomiast wykazywały umiarkowaną aktywność przeciw użytym w testach bakteriom Gram-dodatnim, wartości MIC dla tych związków wobec różnych bakterii Gram-dodatnich wynosiły od 6.25 µg/ml do 200 µg/ml [31].

Wyniki badań mikrobiologicznych pochodnych monenzyny pozwalają na planowanie prac syntetycznych związanych z otrzymywaniem kolejnych pochodnych tego naturalnego antybiotyku. Racjonalnie zaplanowane nowe pochodne monenzyny, które będą aktywne biologicznie mogą potencjalnie zostać wykorzystane do walki z zakażeniami szpitalnymi oraz znaleźć zastosowanie w weterynarii.

7. Zastosowanie monenzyny

Znanych jest ponad 100 antybiotyków jonoforowych, ale tylko trzy: monenzyna, kwas lasalowy i salinomycyna znajdują w chwili obecnej komercyjne zastosowanie. Monenzyna była pierwszym antybiotykiem jonoforowym dopuszczonym do stosowania przez Food and Drug Administration (FDA) w Stanach Zjednoczonych. Ze względu na silne właściwości przeciwbakteryjne i kokcydiostatyczne znalazła zastosowanie w przemysłowej hodowli drobiu.

Kokcydia to pierwotniaki pasożytnicze powszechnie występujące u różnych gatunków zwierząt, które namnażają się w komórkach nabłonka jelit i rozprzestrzeniają się poprzez oocysty wydalone z kałem. Wywołują stany zapalne błony śluzowej jelita cienkiego, w wyniku czego dochodzi do biegunk i ogólnego osłabienia. Mechanizm działania kokcydiostatycznego monenzyny polega na blokowaniu rozwoju trofozoitów pierwotniaków należących do rodzaju *Eimeria* i grupy *Coccidium*, w pierwszej fazie schizogonii. W efekcie korzystny wpływ antybiotyku na wzrost drobiu polega na ograniczeniu namnażania pasożytów, a więc eliminowaniu czynnika osłabiającego wydajność hodowli zwierząt [32, 33]. W profilaktyce kokcydiozy drobiu stosowany jest preparat Mondolar[®], zawierający 10% lub 20% soli sodowej monenzyny.

Kolejne badania udowodniły, że monenzyna może także poprawiać przemianę pokarmu u przeżuwaczy, co powoduje lepsze jego wykorzystanie i w konsekwencji prowadzi do szybszego wzrostu bydła. Stymulacja wzrostu związana jest w tym przypadku z korzystnymi zmianami mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego bydła oraz zwiększaniu ilości trawionego i przyswajanego białka. Preparat Rumenesis[®], zawierający 6,6% monenzyny jest stosowany jako niehormonalny stymulator wzrostu tych zwierząt [34, 35, 36].

Monenzyna stosowana w zalecanych dawkach jako kokcydiostatyk u drobiu lub stymulator wzrostu w hodowli bydła jest stosunkowo bezpieczna, jednak zawsze należy brać pod uwagę możliwość zatrucia zwierząt hodowlanych, a także zanieczyszczenia antybiotykiem produktów pochodzenia zwierzęcego (mięsa, jaj czy mleka).

Pochodne monenzyny ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej stanowią ważny obiekt badań mających na celu zmniejszenie toksyczności, a także uzyskanie związków o nowych właściwościach biologicznych w aspekcie dalszych zastosowań.

BIBLIOGRAFIA

- Moore, C., and B. C. Pressman: "Mechanism of action of valinomycin on mitochondria" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 15, 562-567.
- B. C. Pressman: "Biological applications of ionophores", *Annu. Rev. Biochem.*, 1976, 45, 501-530.
- R. Ferdani, G. W. Gokel: "Ionophores" w: "Encyclopedia of Supramolecular chemistry" Jerry L. Atwood, Jonathan W. Steed (editors), 2004, ISBN-13: 978-0824750565, 760-766.
- M. Dobler: "Natural Cation-binding Agents" w: *Molecular Recognition: Receptors for Cationic Guests* G. W. Gokel (editor), 2004, ISBN: 0080427138, 267-313.
- A. Huczyński: "Synteza, badania spektroskopowe i semiempiryczne estrów Monenzyny A oraz ich kompleksów z kationami metali", Zakład Biochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, rozprawa doktorska.
- A. Huczyński, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski: "Molecular structure of the 1:1 inclusion complex of monensin A sodium salt with acetonitrile", *J. Mol. Struct.*, 2007, 832, 84-89.
- L. E. Day, J. W. Chamberlin, E. Z. Gordeev, S. Chen, M. Gorman, R. L. Hamill, T. Ness, R. E. Weeks, R. Stroshane: "Biosynthesis of monensin", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1973, 4(4), 410-414.
- T. Rezanka, K. Klanova, M. Podojil, Z. Vanek: "Fatty acids of *Streptomyces cinnamonensis*, producer of monensin", *Folia Microbiol.*, 1984, 29(3), 217-221.
- E. Kralovcova, V. Krumphanzl, Z. Vanek: "Improving the production of monensin by *Streptomyces cinnamonensis*", *Folia Microbiol.*, 1984, 29(1), 35-42.
- D. B. Collum, J. H. McDonald III, W. C. Still: "Synthesis of the polyether antibiotic monensin. 3. Coupling of precursors and transformation to monensin", *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 2120-2121.
- P. W. Ledger, N. Uchida, M. L. Tanzer: "Immunocytochemical localization of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: effects of the monovalent ionophore, monensin", *J. Cell Biol.*, 1980, 87, 663-671.
- H. H. Mollenhauer, D. J. Morre, L. D. Rowe: "Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity", *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1031(2), 225-246.
- M. Merion, W. S. Sly: "The role of intermediate vesicles in the adsorptive endocytosis and transport of ligand to lysosomes by human fibroblasts", *J. Cell Biol.*, 1983, 96(3), 644-650.
- M. Marsh, J. Wellstead, H. Kern, E. Harms, A. Helenius: "Monensin inhibits Semliki Forest virus penetration into culture cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1982, 79(17), 5297-5301.
- W. H. Park, C. W. Jung, J. O. Park, K. Kim, W. S. Kim, Y. H. Im, M. H. Lee, W. K. Kang, K. Park: "Monensin inhibits the of renal cell carcinoma via cell cycle arrest or apoptosis", *Int. J. Oncol.* 2003, 22(4), 855-60.
- J. B. Russell: "A proposed mechanism of Monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force", *J. Anim. Sci.*, 1987, 64, 1519-1525.
- P. Dorkov, I. N. Pantcheva, W. S. Sheldrick, H. Mayer-Figge, R. Petrova, M. Mitewa: "Synthesis, structure and antimicrobial activity of manganese (II) and cobalt (II) complexes of the polyether ionophore antibiotic Sodium Monensin A", *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 26-32.
- R. Tanaka, A. Nagatsu, H. Mizukami, Y. Ogiwara, J. Sakakibara: "Studies on chemical modification of monensin VIII. Synthesis of 7-O-substituted-25-carboxymonensins and their Ca²⁺ ion transport activity", *Tetrahedron*, 2001, 57, 3005-3012.
- A. Huczyński, J. Stefańska, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl: "Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters", *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2008, 18, 2585-2589.
- D. C. Johnson, P. G. Spear: "Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells", *J. Virol.*, 1982, 43(3), 1102-1112.
- R. Schlegel, M. Willingham, I. Pastan: "Monensin blocks endocytosis of vesicular stomatitis virus", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 102, 992-998.
- A. Iacoangeli, G. Mellucci-Vigo, G. Risuleo: "The ionophore monensin inhibits mouse polyomavirus DNA replication and destabilizes viral early mRNAs", *Biochimie*, 2000, 82, 35-39.
- J. Adovelande, J. Schrével: "Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo", *Life Sci.*, 1996, 59(20), PL309-315.
- A. Nakamura, S. Nagai, T. Ueda, N. Murakami, J. Sakakibara, H. Shibuya, I. Kitagawa: "Studies on the chemical modification of monensin. III. Synthesis and sodium ion transport activity of macrocyclic monensylamino acid-1,29-lactones", *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39(7), 1726-1730.
- J. W. Westley, C. M. Liu, R. H. Jr Evans, L. H. Sello, N. Troupe, T. Hermann: "Preparation, properties and biological activity of natural and semisynthetic urethanes of monensin", *J. Antibiot.*, 1983, 36(9), 1195-2200.
- A. Nakamura, S. Nagai, T. Takahashi, R. Malhan, N. Murakami, T. Ueda, J. Sakakibara, M. Asano: "Studies on the chemical modification of monensin. IV. Synthesis, sodium ion permeability, and biological activity of 7-O-acyl- and 7-O-alkylmonensins", *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40(9), 2331-2337.
- A. Nagatsu, T. Takahashi, M. Isomura, S. Nagai, T. Ueda, N. Murakami, J. Sakakibara, K. Hatano: "Studies on chemical modification of monensin. V. Synthesis, sodium ion permeability, antibacterial

- activity, and crystal structure of 7-O-(4-substituted benzyl)monensin", *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, 42(11), 2269-2275.
28. R. Tanaka, A. Nagatsu, H. Mizukami, Y. Ogihara, J. Sakakibara: "Studies on chemical modification of monensin IX. Synthesis of 26-substituted monensins and their Na⁺ ion transport activity", *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, 49(6), 711-715.
29. M. Rochdi, A. M. Delort, J. Guyot, M. Sancelme, S. Gibot, J. G. Gourcy, G. Dauphin, C. Gumila, H. Vial, G. Jeminet: "Ionophore properties of monensin derivatives studied on human erythrocytes by ²³Na NMR and K⁺ and H⁺ potentiometry: relationship with antimicrobial and antimalarial activities", *J. Med. Chem.*, 1996, 39(2), 588-595.
30. J. Sakakibara, A. Nakamura, S. Nagai, T. Ueda, T. Ishida, "Studies on the chemical modification of monensin. I. Synthesis and crystal structures of NaBr complexes of monensylamino acids", *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36(12), 4776-4784.
31. A. Huczyński, A. Domańska, I. Paluch, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl: "Synthesis of new semi-synthetic dipodands and tripodands from naturally occurring polyether ionophores", *Tetrahedron Lett.*, 2008 (w druku), doi:10.1016/j.tetlet.2008.06.116
32. R. F. Shumard, M. E. Callender: "Monensin, a new biologically active compound. VI. Anticoccidial activity", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1967, 7, 369-377.
33. A. L. Donoho: "Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment", *J. Anim. Sci.*, 1984, 58(6), 1528-1539.
34. W. K. Lutz, H. K. Wipf, W. Simon: "Alkali-cation specificity and carrier qualities of the antibiotics nigericin and monensin", *Helv. Chim. Acta*, 1970, 53(7), 1741-1746.
35. R. D. Goodrich, J. E. Garrett, D. R. Gast, M. A. Kirick, D. A. Larson, J. C. Meiske: "Influence of monensin on the performance of cattle", *J. Anim. Sci.*, 1984, 58(6), 1484-1498.
36. E. L. Potter, R. L. VanDuyn, C. O. Cooley: "Monensin toxicity in cattle", *J. Anim. Sci.*, 1984, 58(6), 1499-1511.