

# Wpływ stosowania antybiotyków na stres oksydacyjny

**Marta Giergiel, Andrzej Posytniak**

z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego  
– Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Reaktywne formy tlenu (RFT) są nieodłączną częścią oddychania komórkowego. Głównym miejscem ich powstawania są mitochondria, gdzie podczas przenoszenia elektronów i protonów na tlen dochodzi często do tzw. przeciekania i tlen nie ulega całkowitej czteroелектронowej redukcji. Wśród reaktywnych form tlenu można rozróżnić m.in. wolne rodniki: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) oraz rodnik hydroksylowy ( $\cdot OH$ ), a także związki, które wolnymi rodnikami nie są, np. nadtlenuk wodoru ( $H_2O_2$ ). Szczególnie niebezpieczny jest rodnik hydroksylowy

( $\cdot OH$ ), który reaguje w miejscu powstania z pierwszą napotkaną cząsteczką. Inne RFT, choć cechują się mniejszą reaktywnością, mogą przemieszczać się od miejsca powstania i wchodzić w reakcję ze strukturami komórkowymi, takimi jak białka i lipidy (1) prowadząc do ich peroksydacji. Proces ten jest szczególnie niebezpieczny ze względu na jego kaskadowy charakter. Końcowymi produktami tej reakcji są m.in. aldehydy (dialdehyd malonowy – MDA, 4-hydroksynonenal – HNE), które wchodzić w reakcje z innymi strukturami komórkowymi i wykazują

również działanie mutagenne oraz teratogenne (2, 3, 4).

Wyjątkowo wrażliwa na peroksydację jest błona komórkowa, w skład której wchodzi nienasycone kwasy tłuszczowe. Jeśli zostanie zaburzona jej dwuwarstwowa struktura lipidowa, to następuje utrata funkcji ochronnej, na skutek czego zanika nieprzepuszczalność dla niektórych związków. Mimo szkodliwego działania nadmiaru RFT, fizjologiczne ich stężenia są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów (5), ponieważ biorą one udział w walce z drobnoustrojami w stanach zapalnych (6), pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych (7), a także odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu rozrodczego (8).

Organizm jest wyposażony w system antyoksydantów, którego zadaniem jest utrzymanie RFT w bezpiecznych granicach. Należą do niego białkowe antyoksydanty będące enzymami antyoksydacyjnymi i drobnocząsteczkowe antyoksydanty niebiałkowe.

Do głównych enzymów antyoksydacyjnych należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT; 9) i peroksydaza glutationowa (GSH-Px; 10). Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, której produktem jest tlen i nadtlenek wodoru, będący substratem dla katalazy i peroksydazy glutationowej. Wśród drobnocząsteczkowych antyoksydantów możemy wyróżnić rozpuszczalne w wodzie (glutathion, kwas askorbinowy, kwas moczowy) oraz rozpuszczalne w tłuszczach (witaminy A i E, ubiquinon; 11, 12).

Stres oksydacyjny pojawia się, gdy zostanie zaburzona równowaga między procesami utleniania i redukcji z przewagą reakcji utleniania (13).

Niekontrolowana synteza RFT odgrywa znaczącą i często decydującą rolę w patogenezie wielu chorób, m.in.: cukrzyca, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona i wielu innych (14). RFT są również odpowiedzialne za objawy starzenia się (15).

Istnieje jednak wiele czynników, które mają istotny wpływ na ochronę antyoksydacyjną i mogą sprzyjać pojawieniu się stresu oksydacyjnego, m.in. wiek lub płeć (16). Chociaż czynniki endogenne odgrywają kluczową rolę w produkcji RFT, to czynniki egzogenne również mają istotne znaczenie. Jednym z nich są ksenobiotyki, a wśród nich antybiotyki.

### Antybiotyki indukujące powstawanie stresu oksydacyjnego

Działanie antybiotyków może być wielokierunkowe: indukowanie stresu oksydacyjnego w komórkach bakteryjnych może prowadzić do ich śmierci, a także do zwiększonej produkcji RFT w środowisku reakcji, co może uszkadzać komórki gospodarza. Wraz z intensyfikacją produkcji zwierzęcej niebezpiecznie wzrosło zużycie produktów weterynaryjnych zawierających leki przeciwbakteryjne. Wpływ antybiotyków na produkcję RFT jest szeroko dyskutowany w dostępnej literaturze. Część badaczy udowadnia ich wpływ (17, 18), podczas gdy inni całkowicie podważają ich udział (19, 20).

Z powodu zagrożenia szerzącej się lekooporności (21) istnieje potrzeba lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów działania antybiotyków w celu zwiększenia ich skuteczności. Badanie wpływu antybiotyków na stres oksydacyjny pozwoli lepiej przybliżyć to zagadnienie.

Powstawanie reaktywnych form tlenu jest wpisane w mechanizm działania niektórych antybiotyków. Mogą one też powstawać w wyniku ich metabolizmu (22, 23). Jednym z łatwiejszych i tańszych sposobów badania wpływu działania

antybiotyków na stres oksydacyjny są badania na bakteriach (24).

Kohanski i wsp. (25), badając bakteriobójczy mechanizm działania antybiotyków, udowadnia, że podłożem tego działania jest indukcja wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, prowadząca do śmierci komórki. Autorzy porównali więc działanie antybiotyków bakteriobójczych z antybiotykami o działaniu bakteriostatycznym na komórki bakterii Gram-ujemnej *E. coli*. W grupie pierwszej znalazły się: norfloksacylna, ampicylina i kanamycyna, natomiast wśród antybiotyków o działaniu bakteriostatycznym zostały wybrane z różnych klas inhibitory rybosomów (chloramfenikol, spektynomycyna, tetracyklina i erytromycyna) oraz inhibitor polimerazy RNA (rifamycyna). Wszystkie antybiotyki o działaniu bakteriobójczym powodowały uwalnianie rodnika hydroksylowego – wysoce reaktywnej formy tlenu, w przeciwieństwie do antybiotyków o działaniu bakteriostatycznym, które nie prowadziły do jego uwalniania. Ponadto działanie chloramfenikolu, norfloksacyliny i wankomycyny zostało sprawdzone na szczepach *S. aureus*. Produkcja rodnika hydroksylowego następowała po zastosowaniu norfloksacyliny i wankomycyny, nie stwierdzono go natomiast po zastosowaniu chloramfenikolu.

Jedyną możliwą drogą powstania rodnika hydroksylowego jest reakcja Fentona (26) katalizowana przez jony żelaza (które prawdopodobnie pochodzą ze środowiska wewnątrzkomórkowego) w wyniku uszkodzenia centrów żelazowo-siarkowych wchodzących w skład łańcucha oddechowego. Proces uszkodzenia białek żelazowo-siarkowych przez anionorodnik ponadtlenowy prowadzący do uwolnienia jonów żelaza został już wcześniej opisany (27). Głównym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego u *E. coli* jest utlenianie białek łańcucha oddechowego podczas przenoszenia elektronów i protonów na tlen i utlenianie zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) do NAD<sup>+</sup>. Badane antybiotyki (norfloksacylna, kanamycyna i ampicylina) poprzez silną ekspresję genu NADH dehydrogenazy I – znacznie zwiększają (nawet 5-krotnie) stosunek NAD<sup>+</sup>/NADH, podczas gdy podanie bakteriostatycznej spektynomycyny nie daje takiego efektu. Gwałtowny wzrost zużycia NADH po zastosowaniu antybiotyków może świadczyć o znacznym zwiększeniu uwalniania anionorodnika przez łańcuch oddechowy.

Podobne badania zostały przeprowadzone na komórkach ssaków (28), ale innymi metodami niż wcześniej wspomniane w celu uniknięcia pojawiających się w przeszłości zarzutów (19, 20).

### The influence of the antibiotics use on the oxidative stress

Giergiel M., Posylniak A., Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Research Institute, Pulawy

This article aims at presentation of a broad view on the consequences of antibiotics use on the oxidative stress in treated animal. Different mechanisms of antimicrobial activity directed towards microorganisms can also affect important host metabolic pathways. Although numerous studies were conducted, there is still lack information about all the effects of antibiotic therapy and taking into account the mechanisms of antibiotics activity it is difficult to predict the health consequences of their residues for the animal and also for public health. Apart from the already recognized ototoxicity, nephrotoxicity or tendinopathy, the oxidative stress should be noted. Oxidative stress occurs if the production of reactive oxygen species (ROS), prevails over their elimination by antioxidants. ROS are involved in serious damage to cell structures, since they react with lipids, proteins, carbohydrates and DNA. Lipids peroxidation is particularly dangerous for the consumers, because products peroxidation like: malondialdehyde (MDA) and 4-hydroksynonenal have proven carcinogenic properties.

**Keywords:** antibiotics, animals, oxidative stress, public health.

Komórki linii komórkowej nabłonka gruczołu sutkowego MCF-10A zostały poddane działaniu antybiotyków bakteriobójczych: cyprofloksacylny, ampicyliny i kanamycyny, a także antybiotyku o działaniu bakteriostatycznym (tetracyklina). Wszystkie antybiotyki bakteriobójcze wraz ze wzrostem stężenia i czasu ekspozycji prowadziły do zwiększenia wewnątrzkomórkowej produkcji RFT w przeciwieństwie do antybiotyku bakteriostatycznego. W celu wykluczenia wpływu rodzaju linii komórkowej, badania zostały również przeprowadzone na innych komórkach. Wyniki zawsze były takie same: antybiotyki bakteriobójcze indukowały znaczny wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji RFT. W przypadku antybiotyków bakteriostatycznych wzrost RFT był nieznaczny. Badano uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego przez mitochondria oraz nadtlenek wodoru uwalniany zewnątrzkomórkowo.

Po 6- i 96-godzinnej inkubacji komórek z antybiotykami zmierzono parametry peroksydacji lipidów (poziom MDA), białek (karbonylacja białek) oraz DNA ( $\gamma$ -H2AX – białka histonowego, ulegające fosforylacji podczas uszkodzenia DNA i 8-hydroksy-2'-deoksoguanozyny (8-OHdG – ubocznego produktu utleniania DNA). Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost

badanych parametrów. Po inkubacji z tetracykliną nie stwierdzono istotnych zmian.

Autorzy udowodnili również znaczący wpływ antybiotyków na łańcuch oddechowy w mitochondriach. Antybiotyki są inhibitorami kompleksu I i III, które są głównym źródłem RFT. Zahamowanie przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy ma wpływ na:

- spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ )
- spadek produkcji ATP
- spadek ogólnej aktywności metabolicznej.

Na potwierdzenie tej hipotezy autorzy przeprowadzili doświadczenie, w którym inkubowali komórki pozbawione mitochondrialnego DNA z antybiotykami. Wyniki były porównywalne z kontrolą.

Autorzy zaobserwowali również istotne zmiany morfologiczne w mitochondriach po inkubacji z antybiotykami. Były one krótkie, obrzękłe, niekompletne, o dużo mniejszym pofałdowaniu w porównaniu do podłużnych, rurkowatych i bogato rozgałęzionych mitochondriów w komórkach kontrolnych. Świadczy to o przesunięciu równowagi w kierunku podziału (proliferacji), co może prowadzić do utraty potencjału błonowego, spadku aktywności metabolicznej i ogólnie wzrostu stresu oksydacyjnego (29).

Badania *in vitro* zostały porównane z badaniami *in vivo* na myszach. Zwierzęta dostawały terapeutyczne dawki antybiotyków: cyprofloksacynę (12,5 mg/kg m.c./dzień), ampicylinę (28,5 mg/kg m.c./dzień), kanamycynę (15 mg/kg m.c./dzień) lub tetracyklinę (13,5 mg/kg m.c./dzień) w wodzie do picia. Po 16 tyg. znacznie wzrosła peroksydacja lipidów, po 2 tyg. zaobserwowano spadek poziomu glutationu, a po 16 tyg. jego poziom uległ statystycznie istotnemu obniżeniu. Tylko cyprofloksacyna spowodowała statystycznie istotny wzrost RFT.

Ponadto u zwierząt, którym podawano antybiotyki, zbadano w gruczole sutkowym ekspresję genów związanych z ochroną antyoksydacyjną (Sod1, Sod2, Gpx1 i Foxo3a). Po 2 tyg. ekspresja genów wzrosła ponad 2-krotnie, a po 16 tyg. 10-krotnie, natomiast nie zaobserwowano tego wzrostu po podawaniu tetracykliny.

## Fluorochinolony

Do grupy chemioterapeutyków indukujących produkcję RFT należą fluorochinolony. Cechują się one szerokim spektrum działania. Mają zastosowanie w medycynie ludzi i weterynaryjnej szczególnie w leczeniu chorób układu oddechowego i pokarmowego (30, 31).

Działanie bakterioobójcze antybiotyków z tej grupy polega na hamowaniu aktywności topoiizomerazy II (gyrazy

DNA) i topoiizomerazy IV biorących udział w prawidłowym przebiegu procesów replikacji, transkrypcji i naprawy bakteryjnego DNA.

Dwyer i inni (32) badali działanie przeciwbakteryjne **norfloksacyny** jako przedstawiciela fluorochinolonów u *E. coli*. Mechanizm jej działania polega głównie na hamowaniu procesu replikacji i nie jest to jedyny mechanizm bakterioobójczy. Ważną rolę odgrywa wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylogowego. Jednak mechanizm jego powstawania nie jest do końca jasny. Jedyną drogą, w której może on powstać, jest reakcja Fentona, która katalizowana jest przez wolne jony żelaza ( $Fe^{2+}$ ). Anionorodnik ponadtlenkowy, powstający jako produkt uboczny tlenowego metabolizmu, może uszkadzać białkowe centra żelazowo-siarkowe, prowadząc do uwolnienia jonów  $Fe^{2+}$  (33). Powtarzające się cykle utleniania i redukcji białkowych centrów żelazowo-siarkowych dostarczają duże ilości wolnych jonów  $Fe^{2+}$ , które chętnie uczestniczą jako substrat w reakcji Fentona do produkcji rodnika hydroksylogowego. Norfloksacyna może działać pośrednio poprzez pobudzenie ekspresji odpowiednich genów w wyniku aktywacji następujących czynników transkrypcyjnych:

- IscR (iron-sulfur cluster regulator) regulujący operon *iscRUSA* genów odpowiedzialnych za syntezę i budowę centrów żelazowo-siarkowych,
- SoxR, SoxS (regulowanych przez reakcję redox) genów, biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny (SoxS aktywuje m.in. ekspresję *SodA* – dysmutazy ponadtlenkowej, zawierającej jon Mn)
- *fur* – regulator genu związanego z metabolizmem żelaza, a także indukuje SOS DNA w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Czynnikami sprzyjającymi powstawaniu  $OH\cdot$  i zabijaniu komórek są: atp C (a structural and proton-translocating component of ATP synthase) – wchodzi w skład syntazy ATP, a także *iscS* (składnik *IscR*).

**Enrofloksacyna** w wyniku deetylacji (34, 35) jest metabolizowana przez enzymy mikrosomalne cytochromu P450, do głównego metabolitu, cyprofloksacyny. W wyniku tego procesu uwalniane są wolne rodniki (36), które mogą prowadzić do peroksydacji lipidów. Co więcej, fluorochinolony mogą hamować aktywność enzymów cytochromu P450 (37).

Wpływ fluorochinolonów na parametry stresu oksydacyjnego został zbadany zarówno u zwierząt laboratoryjnych (38, 39), jak i kurcząt (40, 41, 17). We krwi młodych kurcząt stwierdzono:

- znaczny wzrost stężenia malodialdehydu (MDA), będący końcowym produktem peroksydacji lipidów

- spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych (41, 17). Szczegóły oraz wyniki badań zawiera **tabela 1**.

Fluorochinolony mogą również wpływać na aktywność enzymów oksydacyjnych (katalazy) poprzez zmianę jej konformacji przestrzennej (42).

## Amfenikole

Kolejną grupą antybiotyków, która indukuje stres oksydacyjny, są amfenikole. Głównym jej przedstawicielem jest **chloramfenikol (CAP)**. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych w wyniku odwracalnego wiązania się z podjednostką 50S rybosomu bakteryjnego.

Chloramfenikol jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania, stosowanym w okulistyce i dermatologii. Jest on szczególnie ceniony w krajach Trzeciego Świata ze względu na skuteczność i cenę. Pomimo znanej jego hemotoksyczności jest stosowany w leczeniu zakażeń *Haemophilus influenzae* opornych na ampicylinę (43), oporną na wankomycynę bakterię *Enterococcus faecium* (44, 45). Ze względu na liczne działania uboczne: niedokrwistość aplastyczną, supresję szpiku kostnego, neutropenię i małopłytkowość, jego użycie jest zakazane u zwierząt gospodarskich (46).

Kluczową rolę w toksyczności chloramfenikolu odgrywa metabolizm. W pierwszym etapie jest on metabolizowany przez enzymy cytochromu P450 (47, 48), w drugim zaś etapie ulega on biotransformacji przez wątrobową transferazę S-glutationu (GST) do pochodnych aldehydowych, które następnie są utleniane przez oksydazę ksantynową. W rezultacie dochodzi do wytwarzania wolnych rodników (49, 50). Hamowana jest również aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm leków. Wpływa także na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, esteraz i amidaz wątrobowych (51, 52). Obecność grupy azotanowej (p-nitro), charakteryzującej chloramfenikol, powoduje poważne uszkodzenie DNA:

- pęknięcia nici DNA,
- hamowanie syntezy DNA i mutacje (53),
- istotne zmiany makrocząsteczek odgrywających rolę w mechanizmie detoksykacji i antyoksydacji (18).

Chloramfenikol powoduje zmiany w mitochondriach (54), a w hodowlach komórkowych powoduje powstawanie megamitochondriów (MG), co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek po dłuższym okresie działania (55).

W rzeczywistości najważniejszym mechanizmem toksyczności CAP wydaje się wzrost produkcji RFT, ale ze zmniejszeniem obrony antyoksydacyjnej (56).

Tabela 1. Wpływ antybiotyków na parametry stresu oksydacyjnego

Antybiotyk	Dawkowanie	Zwierzę	Rodzaj tkanki	Badane parametry	Działanie	Piśmiennictwo
Enrofloksacyna Cyprofloksacyna Norfloksacyna	10 mg/kg m.c./ dzień przez 3 dni w wodzie do picia	3-dniowe kurczęta	osocze, erytrocyty	- stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w osoczu - aktywność katalazy (CAT) w erytrocytach	- MDA wzrosło u wszystkich grup, jednak bez statystycznej istotności - spadek aktywności CAT po podaniu enrofloksacyny i norfloksacyny - wzrost aktywności CAT po podaniu cyprofloksacyny - 5 dnia znaczny wzrost aktywności enzymu stwierdzono we wszystkich grupach, natomiast 7 dnia nastąpił spadek	(41)
Enrofloksacyna	100, 200, 400 mg/kg m.c. per os przez 15, 30 dni	1-dniowe kurczęta	osocze, erytrocyty	- stężenie MDA - aktywność SOD, CAT	- statystycznie istotny wzrost MDA przy stężeniu 400 mg/kg, wyższy po 15 niż po 30 dniach - statystycznie istotny spadek aktywności SOD wraz ze wzrostem dawki, jednak większy po 15 niż po 30 dniach - spadek aktywności CAT wraz ze wzrostem stężenia, jednak bez statystycznej istotności	(17)
Enrofloksacyna Alfa-tokoferol	50 mg/l z wodą do picia, przez 5 dni (100 mg/kg paszy)	1-dniowe kurczęta	wątroby, mięśnie udowe i piersiowe	aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD), GSHPx i (CAT)	- wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD), GSHPx i (CAT) stwierdzono w mięśniach udowych w porównaniu do mięśni piersiowych - istotne różnice w aktywności enzymów (SOD i CAT) stwierdzono pomiędzy zwierzętami, którym podawano antybiotyk, a tymi, od których pobrano narządy po odstawieniu antybiotyku - wyższą aktywność SOD stwierdzono w tkankach po dodatkowej suplementacji octanem $\alpha$ -tokoferolu - nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w aktywności GSHPx pomiędzy grupami	(40)
Enrofloksacyna Chlorpiryfos	10 mg/kg m.c. przez 3 dni 30 mg/kg m.c. w oleju roślinnym (0.2 LD50)	dorośle szczury I gr.: enrofloksacyna II gr.: chlorpiryfos III gr.: enrofloksacyna + chlorpiryfos	wątroba	wit. A, wit. E	I gr.: nieznaczny spadek poziomu obu parametrów przy podawaniu samej enrofloksacyny III gr.: znaczny spadek wit. A (o 19,8%) po 3 h i wit. E o 20,8% po 3 dniach od podania łącznie enrofloksacyny z chlorpiryfosem	(39)
Enrofloksacyna Chlorpiryfos	5 mg/kg m.c. sondą dożołądkowo przez 3 dni 3 mg/kg m.c. sondą dożołądkowo przez 28 dni	dorośle szczury I gr.: enrofloksacyna II gr.: chlorpiryfos III gr.: enrofloksacyna + chlorpiryfos	erytrocyty	aktywność SOD, CAT i GPx	I gr.: - nieznaczny wzrost aktywności SOD do 3 dnia, 7 dnia spadek aktywności o 4,8% - nieznaczny wzrost aktywności CAT o 3-6% - wzrost aktywności GPx o 2-6% 3 gr.: - statystycznie istotny spadek aktywności SOD po 24 h - spadek aktywności CAT po 24 h, a następnie 3 i 7 dnia wzrost aktywności - wzrost aktywności GPx	(38)
Chloramfenikol	28 mg/kg masy ciała przez 10 dni	szczur	osocze, frakcja mikrosomalna	enzymy antyoksydacyjne: - SOD - GPx - CAT - GST antyoksydanty drobnocząsteczkowe: - wit. C - wit. A - glutation (GSH) produkty peroksydacji lipidów: - MDA - nadtlenki lipidów	- statystycznie istotny wzrost aktywności SOD o 63% - spadek aktywności GPx o 53% - spadek aktywności CAT o 44% - spadek aktywności GST o 58% - znaczny spadek poziomu w surowicy wit. C, A - zawartość glutationu spadła o 48% - zawartość MDA wzrosła o 69%, a nadtlenków lipidowych o 71%	(18)
Chloramfenikol	co 6 h per os 28 mg/kg m.c. przez 10 dni	szczur	jądra	- enzymy antyoksydacyjne (SOD, CAT, GST), glutation (GSH) - nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) - produkty peroksydacji lipidów (MDA)	- spadek aktywności SOD - wzrost aktywności CAT, ale nieistotny statystycznie - aktywność GST nie uległa zmianie - poziom GSH wzrósł o 3% - wzrost wytwarzania $H_2O_2$ o 13% - wzrost poziomu MDA o 61%	(57)
Chloramfenikol	poddane ekspozycji w stężeniu 5 mg/l przez 2, 4 i 8 dni	małże <i>Chamelea gallina</i>	trzustkowątroba	aktywność i ekspresja enzymów antyoksydacyjnych (Cu/Zn SOD, MnSOD, CAT) i cytochromu P450 (CYP1A)	- aktywność MnSOD wzrosła o 873,9% - aktywność CuZnSOD wzrosła o 394,4% - aktywność CAT stale rosła wraz z czasem ekspozycji - ekspresja MnSOD znacznie spadła po 4 i 8 dniach ekspozycji - ekspresja CuZnSOD znacznie wzrosła po 4 i 8 dniach - ekspresja cytochromu P450 (CYP1A) również spadła po 4 i 8 dniach ekspozycji	(58)

Tabela 1. Wpływ antybiotyków na parametry stresu oksydacyjnego (cd.)

Antybiotyk	Dawkowanie	Zwierzę	Rodzaj tkanki	Badane parametry	Działanie	Piśmiennictwo
Chloramfenikol	inkubacja <i>in vitro</i> w stężeniu 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml	ludzkie neutrofile		produkcja RFT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji RFT o 313% przy stężeniu 4 µg/ml</li> <li>- spadek produkcji RFT przy wyższych stężeniach</li> <li>- aktywność SOD wzrosła 3-krotnie w neutrofilach inkubowanych w stężeniu 4 µg/ml</li> <li>- znaczny spadek aktywności SOD przy stężeniu 32 µg/ml chloramfenikolu w odniesieniu do wartości uzyskanych z 4 µg/ml</li> <li>- aktywność CAT wzrosła przy stężeniu 4 µg/ml, jak i przy 32 µg/ml</li> <li>- poziom GSH wzrósł po inkubacji neutrofilii z chloramfenikolem w stężeniu 4 µg/ml, a spadł przy stężeniu 32 µg/ml</li> </ul>	(59)
Florfenikol	100 i 200 mg/kg m.c. w postaci paszy leczniczej 2 razy dziennie przez 6 dni	krewetki białe ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	osocze trzustkowątrobą	<ul style="list-style-type: none"> <li>- całkowita aktywność antyoksydacyjna - T-AOC</li> <li>- aktywność SOD,</li> <li>- stosunek GSH/GSSG</li> <li>- stężenie MDA i grup karbonylowych (PC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- statystycznie istotny spadek całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (T-AOC) w osoczu, jak i w trzustkowątrobie</li> <li>- aktywność SOD rosła wraz z czasem podawania antybiotyku (3 i 6 dnia) w stężeniu 100 mg/kg m.c. Przy stężeniu 200 mg/kg m.c. znaczny spadek aktywności</li> <li>- poziom glutationu GSH w osoczu spadł przy stężeniu 100 mg/kg m.c., a w trzustkowątrobie utrzymywał się na poziomie kontroli, przy stężeniu 200 mg/kg m.c. nastąpił spadek zarówno w osoczu, jak i w trzustkowątrobie</li> <li>- statystycznie istotny spadek stosunku GSH/GSSG przy obu stężeniach</li> <li>- stężenie MDA i PC w trzustkowątrobie podniosło się wraz ze wzrostem stężenia stosowanego antybiotyku i czasem ekspozycji</li> <li>- wszystkie parametry wróciły do normy w ciągu 3-6 dni od odstawienia leku</li> </ul>	(60)
Kanamycyna	inkubacja komórek w stężeniu od 0.6 do 6.0 mM (EC50) antybiotyku przez 24 h	<i>in vitro</i> na melanocytach przy użyciu linii komórkowej ludzkich melanocytów		SOD, CAT, GPx	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktywność SOD wzrosła przy stężeniu 0,6 mM o 35%, przy stężeniu 6,0 mM, o 62% w porównaniu do próby kontrolnej</li> <li>- aktywność CAT wzrosła o 34% przy stężeniu 6,0 mM, a przy stężeniu 0,6 mM o 63%</li> <li>- nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w aktywności GPx przy stężeniu 0,6 mM w porównaniu do kontroli, ale przy stężeniu 6,0 mM stwierdzono statystycznie istotny spadek aktywności enzymu o 30%</li> </ul>	(65)

Działanie chloramfenikolu zostało gruntownie przebadane na zwierzętach laboratoryjnych (18, 57), na małżach (58), a także *in vitro* na neutrofilach ludzi (59). Szczegóły i wyniki badań zamieszczono w tabeli 1.

Wyniki badań wskazują, że podczas metabolizmu chloramfenikolu powstaje przede wszystkim anionorodnik ponadtenkowy, ale także inne RFT, np. nadtlenek wodoru.

Spadek ekspresji MnSOD po dłuższej ekspozycji na działanie chloramfenikolu może wskazywać na zmiany w mitochondriach pod wpływem działania chloramfenikolu, a pośrednio przez RTF (54).

Wyniki wskazują, że główną RFT jest anionorodnik ponadtenkowy. Widać również, że zwiększenie stężenia chloramfenikolu upośledza, uszkadza i wyczerpuje ochronę antyoksydacyjną, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (51).

W medycynie weterynaryjnej zamiast zakazanego chloramfenikolu (46) stosuje się **florfenikol**, który cechuje się podobną budową i spektrum działania, jednak nie powoduje tak poważnych skutków ubocznych. Jego wpływ na parametry stresu oksydacyjnego został zbadany u krewetek białych (60). Szczegóły i wyniki badania umieszczono w tabeli 1.

### Aminoglikozydy

Antybiotyki te działają bakteriobójczo poprzez trwałe wiązanie się z podjednostką 30S rybosomu, zaburzając przez to proces translacji w komórce bakteryjnej, co prowadzi do powstania białek, o zmienionej konformacji, które po wbudowywaniu w błonę komórkową zmieniają jej potencjał i przepuszczalność.

Kohanski i inni (61) zbadali mechanizm działania aminoglikozydów na

przykładzie *E. coli*, w którym udowodniają, że interakcja pomiędzy antybiotykiem a rybosomami komórki bakteryjnej w konsekwencji prowadzi do uwolnienia RFT i jej śmierci. Podstawową konsekwencją tego oddziaływania jest wzrost niedopasowanych tRNA, co prowadzi do syntezy wadliwego białka. Część z tych białek zostaje wbudowana do błony komórkowej.

W wyniku nieprawidłowego pofałdowania pobudzają one dwuskładnikowy czujnik odpowiedzi na stres CpxA, a ten fosforyluje białko CpxR, regulujące ekspresję białek w odpowiedzi na stres, np. proteazę DegP, w celu ochrony komórki przed zwiększeniem ilości uszkodzonych białek w błonach komórkowych. CpxA może również aktywować dwuskładnikowy czynnik transkrypcyjny ArcA. Aktywacja systemu w odpowiedzi na stres, w tym ArcA, prowadzi do zmian

w metabolizmie i systemie oddechowym, które sprzyjają pojawieniu się stresu oksydacyjnego, produkcji rodnika hydroksylowego i w końcu śmierci komórki. Działanie aminoglikozydów nie ogranicza się jedynie do bakteryjnych rybosomów, ale mają one również wpływ na rybosomy mitochondrialne (62).

Głównymi działaniami niepożądanymi przy stosowaniu antybiotyków jest ototoksyczność i nefrotoksyczność, których występowanie jest również łączone ze stresem oksydacyjnym (63, 64). Wpływ kanamycyny na aktywność enzymów antyoksydacyjnych został zbadany *in vitro* przy użyciu linii komórkowej ludzkich melanocytów (65). Zaobserwowano wzrost aktywności SOD i CAT, natomiast spadek GPx, co może świadczyć o hamowaniu aktywności peroksydazy przez kanamycynę.

Gentamycyna również indukuje powstawanie stresu oksydacyjnego, z czym mogą być związane jej właściwości neurotoksyczne (63). Randjelovic i wsp. (66) podawali gentamycynę szczurom do otrzewnowo 100 mg/kg m.c. razem z selenem w celu zahamowania indukcji stresu oksydacyjnego. Po podaniu gentamycyny peroksydacja lipidów (poziom MDA), a także białek (wzrost poziomu grup karbonylowych) znacznie wzrosła. W grupie, gdzie podawany był selen, udało się ją zatrzymać.

## Podsumowanie

Przytoczone przykłady, a także wyniki badań zaprezentowane w tabeli 1 jednoznacznie wykazują znaczący wpływ antybiotykoterapii na parametry stresu oksydacyjnego. Jest to tym bardziej istotne, że antybiotyki były badane w większości przypadków w dawkach i drogą podania rutynowo stosowaną podczas leczenia. Jednakże trudno jest przewidzieć kierunek zmian, biorąc pod uwagę różne gatunki zwierząt, dawkę i drogę podania leku, a także wiek, płeć oraz rodzaj tkanki.

Indukcja stresu oksydacyjnego z jednej strony stanowi kolejny sposób walki z drobnoustrojami, ale trzeba wziąć pod uwagę, że może być on szkodliwy dla całego organizmu.

Zwiększenie dawki i czasu ekspozycji antybiotyków znacznie upośledza ochronę antyoksydacyjną i wyczerpuje wszelkie działania kompensacyjne organizmu. Długotrwałe i częste ich stosowanie może prowadzić do kumulacji (powstałych w wyniku stresu oksydacyjnego) nieodwracalnych zmian w strukturach komórkowych, a w konsekwencji do chorób. Co więcej, jak się okazuje, przyczyną ubocznych skutków stosowania antybiotyków są właśnie RFT.

## Piśmiennictwo

- Giergiel M., Zielinska A., Legutko K., Kankofer M.: Protein and Lipid Peroxidation Intensity in Cows and Female Calves. *Acta Sci. Vet.* 2014, **42**, 1185.
- Didžiapetrienė J., Bublevič J., Smalytė G., Kazbarienė B., Stukas R.: Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2014, **50**, 204–208.
- Guéraud F., Taché S., Steghens J.P., Milkovic L., Borovic-Sunjic S., Zarkovic N., Gaultier E., Naud N., Hélie-Toussaint C., Pierre F., Priyemko N.: Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free Radic Biol Med.* 2015, **83**, 192–200.
- Zhong H., Yin H.: Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* 2015, **4**, 193–199.
- Buonocore G., Perrone S., Tataranno M.L.: Oxygentoxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2010, **15**, 186–190.
- Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W.: The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, **397**, 342–344.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L.: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000, **279**, 1005–1028.
- Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C.: The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, **42**, 1634–1650.
- Bartosz G.: *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2, Part O (Ed.: T. Grune), Springer-Verlag, Berlin, 2005, 109–149.
- Espinoza S.E., Guo H., Fedarko N., De Zern A., Fried L.P., Xue Q.L., Leng S., Beamer B., Walston J.D.: Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008, **63**(5), 505–509.
- Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F.C.: Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, *J. Dairy Sci.* 1993, **76**, 2812–2823.
- Young I.S., Woodside J.V.: Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001, **54**, 176–186.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2007, 4<sup>th</sup> ed. Oxford University Press, Oxford.
- Knight J.A.: Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1995, **25**, 111–121.
- Harman D.: Free Radical Theory Of Ageing: Applications. *Asia Pacific Heart J.* 1998, **7**, 169–177.
- Giergiel M., Lopucki M., Stachowicz N., Kankofer M.: The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res.* 2012, **24**, 561–569.
- Ibrahim I.G., Yarsan E.: Enrofloxacin drug induced reactive oxygen species. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 2011, **1**, 489–491.
- Farombi E.O.: Antioxidant and hepatic lipid peroxidation in chloramphenicol treated rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 2001, **194**, 91–98.
- Keren L., Wu Y., Inocencio J., Mulcahy L.R., Lewis K.: Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*. 2013, **339**, 1213.
- Liu Y., Imlay J.A.: Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. 2013, **339**, 1210.
- Walsh C.: Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* 2003, **1**, 65–70.
- Teo, S., Pohl, L., Halpert, J.: Production of superoxide anion radicals during the oxidative metabolism of amino-chloramphenicol. *Biochem. Pharmacol.* 1986, **35**, 4584–4586.
- Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.: Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front. Biosci.* 1999, **4**, 339–345.
- Albessa I., Becerra M.C., Battán P.C., Páez P.L.: Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, **317**, 605–609.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J.: A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 2007, **130**, 797–810.
- Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J.: Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, **11**, 371–84.
- Imlay J.A.: Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* 2006, **59**, 1073–1082.
- Kalghatgi S., Spina C.S., Costello J.C., Liesa M., Morones-Ramirez J.R., Słomovic S., Molina A., Shirihai O.S., Collins J.J.: Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci. Transl. Med.* 2013, **192**, 192–185.
- Seo A.Y., Joseph A.M., Dutta D., Hwang J.C., Aris J.P., Leeuwenburgh C.: New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J. Cell. Sci.* 2010; **123**:2533
- Martinez M., McDermott P., Walker R.: Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet. J.* 2006, **172**, 10–28.
- Gotfried M.H., Grossman R.F. Short-course fluoroquinolones in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Expert Rev. Respir. Med.* 2010, **4**, 661–672.
- Dwyer D.J., Kohanski M.A., Hayete B., Collins J.J.: Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2007, **3**, 91.
- Keyer K., Imlay J.A.: Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, **93**, 13635–13640.
- Küng K., Riond L., Wanner M.: Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Vet. Pharmacol. Ther.* 1993, **16**, 462–468.
- Flammer K., Aucoin D.P., Whitt D.A.: Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in African Grey Parrots following single and multiple doses. *Vet. Pharmacol. Ther.* 1991, **14**, 359–366.
- Gurbay A. and Gonthier B.: Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, **30**, 1118–1121.
- Shlosberg A., Ershov E., Bellaiche M., Hanji V., Weisman Y., Soback S.: The inhibitory effects of the fluoroquinolone antimicrobials norfloxacin and enrofloxacin on hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in broiler chickens. *Drug Metabol. Drug Interact.* 1997, **14**, 109–122.
- Barski D., Spodniewska A., Zasadowski A.: Activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in rats exposed to chlorpyrifos and enrofloxacin. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011, **14**, 523–529.
- Spodniewska A., Barski D., Giżejewska A.: Effect of enrofloxacin and chlorpyrifos on the levels of vitamins A and E in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015, **40**, 587–591.
- Carreras I., Castellari M., García Regueiro J.A., Guerrero L., Esteve-García E., Sárrega C.: Influence of Enrofloxacin Administration and  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate Supplemented Diets on Oxidative Stability of Broiler Tissues. *Poultry Sci.* 2004, **83**, 796–802.
- Altunordu S., Eraslan G.: Effects of some quinolone antibiotics on malondialdehyde levels and catalase activity in chicks. *Food Chem. Toxicol.* 2009, **47**, 2821–2823.
- Qin P., Liu R.: Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: A combined molecular and cellular study. *J. Hazard. Mater.* 2013, **252–253**, 321–329.
- Holt D.E., Harvey D., Hurley R.: Chloramphenicol toxicity. *Adv. Drug React. Toxicol. Rev.* 1993, **12**, 83–95.
- Lautenbach E., Schuster M.G., Bilker W.B., Brennan P.J.: The role of chloramphenicol in the treatment of blood stream infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Clin. Infect. Dis.* 1998, **27**, 1259–65.
- Ricaurte J.C., Boucher H.W., Turett G.S., Moellering R.C., Labombardi V.J., Kislak J.W.: Chloramphenicol treatment for vancomycin resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001, **7**, 17–21.
- Śniegocki T., Posnyak A.: Chloramfenikol – zakazany antybiotyk – nowe problemy wynikające ze skażenia pasz. *Pasze Przemysłowe* 2014, 42–47.
- Miranda C.L., Henderson M.C., Buhler D.R.: Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1998, **148**, 37–244.
- Farombi E.O., Nwankwo J.O., Wara S.H., Odutola B., Emersole G.O.: Chloramphenicol and ampicillin-induced changes in rat hepatic esterase and amidase activities. *Biosci. Rep.* 2000, **20**, 13–19.
- Holt D.E., Hurley R., Harvey D.: Metabolism of chloramphenicol by glutathione S-transferase in human fetal and neonatal liver. *Biol. Neonate.* 1995, **67**, 230–239.
- Holt D.E., Ryder T.A., Fairbairn A., Hurley R., Harvey D.: The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.* 1997, **16**, 570–576.
- Farombi E.O., Adamoye O.A., Emerole G.O.: Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: protective role of antioxidants. *Pharmacol. Toxicol.* 2002, **91**, 129–134.
- Somjetlerdcharoen A.: Chloramphenicol concerns in shrimp culture. *Aquaculture, Asia* 2002, **7**, 51–54.

53. Yunis A.A.: Differential in-vitro toxicity of chloramphenicol, nitroschloramphenicol, and thiamphenicol. *Sex. Transm. Dis.* 1984, **11**, 340–342.
54. Wakabayashi, T., Karbowski M.: Structural changes of mitochondria related to apoptosis. *Biol. Signal Recept.* 2001, **10**, 26–56.
55. Karbowski M., Kurono C., Wozniak M., Ostrowski M., Teranishi M., Soji T.: Cycloheximide and 4-OH-TEMPO suppress chloramphenicol-induced apoptosis in RL-34 cells via the suppression of the formation of Megamitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* 1999, **1449**, 25–40.
56. Gomirato G., Nigro N.: An antioxidant in pediatrics. *Mi-nerva Pediatr.* 1996, **48**, 321–324.
57. Oyagbemi A.A., Adedara I.A., Saba A.B., Farombi E.O.: Role of oxidative stress in reproductive toxicity induced by co-administration of chloramphenicol and multivitamin-haematinics complex in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010, **107**, 703–708.
58. Monari M., Foschi J., Cortesi P., Rosmini R., Cattani O., Serrazanetti G.P.: Chloramphenicol influence on antioxidant enzymes with preliminary approach on microsomal CYP1A immune positive-protein in *Chamelea gallina*. *Chemosphere* 2008, **73**, 272–280.
59. Páez P.L., Becerra M.C., Albesa I.: Chloramphenicol-Induced Oxidative Stress in Human Neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008, **103**, 349–353.
60. Ren X., Pan L., Wang L.: Effect of florfenicol on selected parameters of immune and antioxidant systems, and damage indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei* following oral administration. *Aquaculture* 2014, **432**, 106–113.
61. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J.: Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 2008, **135**, 679.
62. Hutchin T., Cortopassi G.: Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1994, **38**, 2517.
63. Sha S.H., Schacht J.: Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear. Res.* 1997, **128**, 112–118.
64. Xie J., Talaska A.E., Schacht J.: New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear. Res.* 2011, **281**, 28–37.
65. Wrześniok D., Otręba M., Beberok A., Buszman E.: Impact of Kanamycin on Melanogenesis and Antioxidant Enzymes Activity in Melanocytes – An In Vitro Study. *J. Cell. Biochem.* 2013, **114**, 2746–2752.
66. Randjelovic P., Veljkovic S., Stojiljkovic N., Velickovic L., Sokolovic D., Stoiljkovic M., Ilic I.: Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2012, **35**, 141–148.

---

Dr Marta Giergiel,  
e-mail: [marta.giergiel@gmail.com](mailto:marta.giergiel@gmail.com)