Peptydy przeciwbakteryjne jako alternatywa dla tradycyjnej antybiotykoterapii

Wojciech Rogóż¹, Jakub Rech¹, Daniel Sypniewski¹, Ilona Bednarek¹

¹ Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Autor do korespondencji: Daniel Sypniewski, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej SUM, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, e-mail: dsypniewski@sum.edu.pl

Antimicrobial peptides as an alternative to traditional antibiotic therapy

Antibacterial peptides form part of a wider group of *antimicrobial peptides* (AMPs) that protect organisms against pathogens. Over 3000 of AMPs are known, both natural and synthetic derivatives. They display activity against strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, and can also be effective as antiviral agents or neutralize natural toxins. The most active and significant AMPs are defensins and cathelicidins. These are metabolites synthesized by both prokaryotic and eukaryotic organisms, constituting an element of unspecific defense of the organisms. These peptides exhibit similar characteristics and enable the destruction of pathogens, and affect the mechanisms of innate body defense. Animals such as the varan, the Tasmanian devil, or the giant panda, synthesize AMP displaying very promising properties, giving them the potential for use in therapy. The aim of the article is to characterize antimicrobial peptides, especially from the group of defensins and cathelicidins, and to present the current data on their therapeutic potential in the context of the growing problem of antibiotic resistance.

Keywords: antimicrobial peptides (AMPs), defensins, cathelicidins.

© Farm Pol, 2019, 75 (2): 84–91

Wstęp

Nieświadome wykorzystywanie naturalnych produktów zawierających antybiotyki (np. w postaci spleśniałych produktów sojowych używanych w starożytnych Chinach do oczyszczania ran) towarzyszy człowiekowi od początków rozwoju cywilizacji. Naukowe wyjaśnienie zjawiska antybiozy nastąpiło na przełomie XIX i XX w., a pierwszym antybiotykiem wyizolowanym w czystej postaci była penicylina, odkryta w 1928 r. przez Aleksandra Fleminga. Od tego momentu naukowcy zaczęli poszukiwać i odkrywać nowe

antybiotyki, jak również modyfikować chemicznie znane antybiotyki naturalne, dając początek ich półsyntetycznym pochodnym. Swoboda w dostępie i brak kontroli nad ich stosowaniem szybko doprowadziły – zaledwie po upływie około 20 lat – do końca tak zwanej „złotej ery antybiotyków”. Zaczęły pojawiać się nowe szczepy bakterii, przeciwko którym znane antybiotyki i chemioterapeutyki okazywały się nieskuteczne. Wśród wielu przyczyn tego zjawiska wymienia się przede wszystkim nadużywanie antybiotyków w terapii czy stosowanie antybiotyków jako dodatków do paszy zwierząt [1, 2]. Obecnie obserwujemy alarmujące tempo narastania zjawiska antybiotykooporności [3]. Aby mu przeciwdziałać, konieczne jest między innymi poszukiwanie nowych związków czynnych, które zastąpią nieskuteczne obecnie antybiotyki, zwiększą ich aktywność lub uniemożliwią bakteriom wykorzystanie wykształconych mechanizmów oporności. Taką grupą związków mogą być peptydy przeciwdrobnoustrojowe AMP (ang. AMPs – *antimicrobial peptides*). Do AMP o największej aktywności i znaczeniu należą defensyny i katelicydyny. Są to metabolity syntetyzowane zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne, stanowiąc element obrony nieswoistej organizmu. W obrębie poszczególnych grup peptydy te wykazują podobne cechy i umożliwiają niszczenie patogenów i/lub oddziałują na inne mechanizmy obronne organizmu [4]. Liczne zwierzęta, takie jak waran, diabeł tasmański czy panda wielka, syntetyzują AMP o bardzo obiecujących właściwościach, nadających im potencjalnie możliwość wykorzystania w terapii. Celem niniejszego artykułu jest charakterystyka peptydów przeciwdrobnoustrojowych, głównie z grupy defensyn i katelicydyn oraz

przedstawienie najnowszych danych dotyczących ich potencjału terapeutycznego w kontekście narastającego problemu antybiotykooporności.

Ogólna charakterystyka peptydów przeciwbakteryjnych

Peptydy przeciwbakteryjne wchodzą w skład szerszej grupy tzw. peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które chronią organizmy przed zagrożeniami ze strony patogenów, jako elementy odporności nieswoistej. Są wytwarzane zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Znanych jest już ponad 3000 peptydów AMP zarówno naturalnych, jak i pochodnych syntetycznych [5]. Wszystkie wykazują aktywność względem szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także mogą być skutecznymi czynnikami przeciwwirusowymi oraz neutralizować toksyny naturalne. Ponadto, mogą wpływać na aktywność limfocytów T, neutrofilów oraz komórek dendrytycznych. Wśród zwierząt wyższych zdolność do wytwarzania AMP potwierdzono w przypadku wielu gatunków ssaków, m.in. świni, niektórych gatunków bydła, małp, myszy, szczurów oraz człowieka [5, 6].

Peptydy przeciwbakteryjne obejmują liczne grupy niezwykle różnorodnych związków o zbliżonej strukturze, jednak największe znaczenie praktyczne mają dwie grupy AMP: katelicydyny i defensyny. Przykładowe działania defensyn i katelicydyn u ssaków, wskazujące na ich pleiotropową aktywność biologiczną, obejmują:

- aktywację komórek dendrytycznych;
- aktywność proangiogenną;
- działanie chemotaktyczne na neutrofile, monocyty i limfocyty T;
- degranulację mastocytów;
- neutralizację endotoksyn i działanie opsonizujące;
- indukcję cytokin w komórkach nabłonkowych i monocytach;
- inhibicję oksydazy neutrofilów.

Pojęcia „peptydy przeciwdrobnoustrojowe” i „antybiotyki peptydowe” w wielu publikacjach używa się zamiennie [7]. Jednak poprawniejsze jest użycie nazwy „antybiotyki peptydowe” do określenia takich peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które znalazły praktyczne zastosowanie w zwalczaniu patogenów. Zarówno nowo odkrywane AMP, jak i „tradycyjne” antybiotyki peptydowe, stosowane w medycynie od lat, jak polimyksyny czy bacytracyna, zbudowane są z aminokwasów, zarówno enancjomerów L, jak i D [8]. Peptydowe związki przeciwdrobnoustrojowe można podzielić na dwie grupy: cząsteczki o sekwencji kodowanej w DNA i syntezowanych na rybosomach (zgodnie z ogólnymi mechanizmami ekspresji genów w komórkach) oraz

peptydy syntetyzowane wyłącznie przez nierybosomalne enzymy lub kompleksy enzymatyczne. Pierwsza z nich to najczęściej elementy odporności wrodzonej – tutaj zaliczane są np. katelicydyny i defensyny; natomiast druga grupa to przeważnie produkty metabolizmu wtórnego bakterii (polimyksyny, gramicydyny, bacytracyna) [4, 7, 8]. Ich mechanizm działania jest bardzo różnorodny, podobnie jak zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Mogą zaburzać syntezę ściany komórkowej, funkcję błon biologicznych, hamować replikację DNA i/lub ekspresję genów [8]. Cechują się też zazwyczaj wysoką toksycznością i brakiem możliwości wprowadzania ich do organizmu drogą doustną, z powodu bardzo niskiej wchłanialności z przewodu pokarmowego [4, 7, 8].

Cząsteczki AMP są zbudowane najczęściej z kilkunastu aminokwasów, choć niektóre z nich mogą być tworzone nawet przez 200 aminokwasów. Cechy wspólne peptydów przeciwbakteryjnych to: niewielka masa cząsteczkowa (w porównaniu do innych peptydów), budowa liniowa lub cykliczna oraz kationowy lub hydrofobowy charakter [5]. Z reguły kodowane są monogenowo i stanowią cechę charakterystyczną dla danego gatunku. Ich klasyfikacja, ze względu na ogromną różnorodność, nie jest jednoznaczna i różni autorzy opierają się na odmiennych kryteriach, takich jak sekwencja aminokwasowa [9].

Bakterie wykształciły liczne metody oporności na AMP. Należą do nich głównie: zmiana ładunku powierzchni komórek, wykształcenie białkowych pomp transbłonowych usuwających AMP z wnętrza komórki, zaburzenie syntezy katelicydyn w infekowanym organizmie, wytwarzanie enzymów degradujących cząsteczki AMP czy też wykształcenie otoczki chroniącej komórkę bakteryjną [4, 6]. Mechanizmy oporności wraz z przykładami bakterii stosujących daną strategię zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Mechanizmy unikania oddziaływania defensyn i katelicydyn stosowane przez bakterie patogenne (opracowano na podstawie [4, 6]).

Table 1. Mechanisms of avoidance of defensins and cathelicidins activities displayed by pathogenic bacteria (based on [4, 6]).

Mechanizm oporności na AMP	Przykłady bakterii patogenicznych wykorzystujących dany mechanizm
Zmiana ładunku powierzchni bakterii	<i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i>
Aktywność pompy transbłonowej do usuwania katelicydyn	<i>Neisseria</i>
Obecność otoczki	<i>Klebsiella</i>
Zmiany dotyczące białek błony zewnętrznej	<i>Yersinia</i>
Zahamowanie syntezy katelicydyn na poziomie mRNA	<i>Shigella</i>
Enzymy proteolityczne degradujące defensyny i katelicydyny	<i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Streptococcus</i>

Defensyny

Pojęcie *defensyny* wprowadzono do literatury w 1985 r. [9]. Są to niewielkie peptydy (masa 3–5 kDa), których cząsteczki mają strukturę β -harmonijki i zawierają sześć reszt cysteiny, powiązanych trzema mostkami siarczkowymi [10]. Znanych jest już ponad 550 defensyn naturalnych [11, 12]. Występują one zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych [13]. Dzielą się na defensyny ssaków, defensyny bezkręgowców i defensyny roślin. Pierwsza grupa podzielona jest na trzy podgrupy: defensyny α , β i θ [11, 12, 14].

Defensyny są w stanie neutralizować patogeny według mechanizmu wykorzystującego oddziaływanie elektrostatyczne z błoną komórkową bakterii [15]. Możliwe jest to dzięki różnicy w budowie błon komórek prokariotycznych i eukariotycznych [11]. To właśnie skład biochemiczny błony jest głównym czynnikiem decydującym o wydajności jej permeabilizacji [16]. Defensyny wykazują zarówno działanie bakteriobójcze, związane z oddziaływaniem z bakteryjną ścianą i/lub błoną komórkową, jak i przeciwwirusowe. Związane jest ono, w przypadku wirusów otoczkowych, z oddziaływaniem ze składnikami otoczek białkowo-lipidowych, a także ze stymulowaniem aktywacji apoptozy w zainfekowanych komórkach organizmu [17].

Defensyny są także zdolne do regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu w odpowiedzi na pojawiający się patogen [18]. Wprowadzenie pochodzących od człowieka defensyn α do makrofagów myszy silnie stymuluje ich zdolność do fagocytozy. Defensyny α człowieka stymulują syntezę cytokin prozapalnych takich jak TNF- α i interleukina 1. Z kolei synteza defensyna HBD-3 (ang. *human β -defensin-3*) w organizmie człowieka jest związana z zahamowaniem rozwoju stanu zapalnego [18]. Defensyny mogą także wywoływać efekt chemotaktyczny. Przedstawiciele defensyn β są pod tym kątem selektywne i wywołują reakcję jedynie komórek posiadających receptory CCDC6 (ang. *coiled-coil domain containing 6*), natomiast peptydy α wywołują efekt chemotaktyczny wobec komórek dendrytycznych i limfocytów T [4, 11].

Defensyny α nazywane są defensynami klasycznymi i znanych jest ich około 80. Wykryto je m.in. u królików, myszy, szczurów i świnek morskich. U ludzi dokładnie opisano tylko sześć z nich: HNP-1, -2, -3, -4, (ang. *human neutrophil peptide*), występujące w ziarnistościach neutrofilii, oraz HD-5 i 6 (ang. *human defensin*), tworzone w komórkach Paneth'a jelita cienkiego i w komórkach nabłonka narządów rodnych kobiet [4, 11]. Defensyny α powstają w bardzo dużych ilościach w neutrofilach [19]. Są aktywne przeciwko bakteriom, grzybom i wirusom w stężeniach 1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Ich aktywność często hamowana jest przez jony wapnia, sodu, a także białka osocza. Z przeprowadzonych badań wynika, że defensyny wykazują różną aktywność przeciwko poszczególnym patogenom. Na przykład największą aktywność przeciwko *Staphylococcus aureus* wykazuje HNP-2, a najmniejszą HNP-4. Z kolei przeciwko *Enterobacter aerogenes* najsilniej działa HNP-4, a najsłabiej HNP-1. Defensyny mogą też indukować adhezję bakterii patogennych, takich jak *Haemophilus influenzae*, do powierzchni komórek wytwarzających te peptydy [4, 11]. Mechanizm ich działania przeciwbakteryjnego oparty jest głównie na wiązaniu kwasów teichojowych, obecnych w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich [17].

W literaturze opisano około 190 defensyn β . Pierwszą z nich była bydlęca defensyna TAP (ang. *tracheal antimicrobial peptide*) wyizolowana w 1991 r. z tchawicy krowiej: [4, 20]. Jest ona skuteczna wobec *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Wartości MIC mieszczą się w zakresie 6–125 $\mu\text{g}/\text{ml}$. U człowieka opisano 48 defensyn β (ang. *human beta defensin* – HBD), z czego dokładną strukturę poznano tylko w przypadku 12 (m.in. HBD-1, HBD-2, HBD-3, HBD-4). Występują w wielu różnych narządach, takich jak tchawica, oskrzela, grasicca, jądra, pochwa, prostata, błona śluzowa policzków, dziąseł i języka [4, 11]. Wydzielane są przez komórki nabłonkowe błony śluzowej i skóry [19]. Defensyny β mają zróżnicowane spektrum działania, jednak najczęściej są aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów z rodzaju *Candida* [4, 11, 15].

Ostatnia z grup defensyn kręgowców, θ (teta), nie występuje u ludzi, szympanów i goryli. Przyczyną tego zjawiska jest obecność kodonu „stop” w środku sekwencji kodującej (tzw. pseudogeny). Występują natomiast u makaków (ang. *Rhesus theta defensin* – RTD-1, RTD-2, RTD-3) i pawianów (ang. *Olive baboon theta defensin* – BTD-1, BTD-2, BTD-3, BTD-4, BTD-5). Wykazują aktywność bakteriobójczą względem *Listeria monocytogenes*, szczepów antybiotykoopornych MRSA (ang. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) i VRE (ang. *Vancomycin-resistant Enterococcus*) oraz grzybów *C. albicans*. W przeciwieństwie do defensyn α i β , zachowują swoją aktywność w środowisku zawierającym jony metali i białka osocza. Tworzone są przez dwa dziewięcioaminokwasowe peptydy połączone w sposób cykliczny [4].

Dwie pozostałe grupy to defensyny bezkręgowców i roślin. Do pierwszej z nich zaliczane są m.in. peptydy wykryte u *Drosophila melanogaster* (drozomycyna) lub *Mytilus galloprovincialis* (ang. *Mediterranean mussel defensin* – MGD-1).

Defensyny roślinne mają podobne do owadzych masy cząsteczkowe, a pierwszą z wykrytych była γ -tionina. Cechą charakterystyczną defensyn roślinnych jest ukierunkowanie ich aktywności przede wszystkim przeciwko grzybom, a dopiero w drugiej kolejności przeciwko bakteriom [4, 5, 13].

Katelicyny

Jedną z podstawowych cech odróżniających katelicyny od defensyn jest fakt, iż są one syntezowane i magazynowane w organizmie w postaci prekursorów: pre-propeptydów [4]. Opisane w literaturze katelicyny charakteryzuje ogromna różnorodność strukturalna. Cząsteczki katelicyn są zbudowane ze 128–143 reszt aminokwasowych tworzących następujące regiony [9, 21]:

- N-końcowa sekwencja sygnałowa, złożona z 29–30 aminokwasów;
- domena katelinowa – charakterystyczna wyłącznie dla katelicyn, tworzona przez 99–114 reszt aminokwasów;
- C-końcowa domena, zbudowana z 12–100 aminokwasów. Jest regionem wykazującym największe zróżnicowanie strukturalne. To właśnie ten region stanowi biologicznie czynny peptyd, który uwalniany jest w wyniku hydrolizy przez odpowiednie enzymy proteolityczne.

W przeciwieństwie do innych AMP, katelicyny mają stosunkowo niską homologię domeny C-końcowej. Cząsteczki katelicyn mają na ogół strukturę α -helisy złożonej z nie więcej niż 40 reszt aminokwasów, ale istnieją też przykłady o strukturze β -harmonijki (protegryna), cyklicznej (bektencyna bydła), katelicyny bogate w tryptofan (bydlęca indolicyna, 13 reszt aminokwasów) lub w prolinę i argininę (katelicyna OaBac owcy) [10].

Katelicyny występują u owadów, ryb, płazów i ssaków, przy czym katelicyny ssaków wyraźnie różnią się od pozostałych. Jedyną znaną katelicyną występującą w organizmie człowieka i naczelników jest LL-37. Powstaje na drodze modyfikacji enzymatycznej prepropeptydu hCAP-18 (ang. *human cationic antimicrobial peptide 18*) [9, 21, 22]. LL-37 to amfipatyczny i helikalny peptyd zbudowany z 37 aminokwasów. Występuje w całym organizmie, a spektrum jego działania przeciwbakteryjnego jest bardzo szerokie [23, 24]. hCAP-18 jest produktem ekspresji genu CAMP zlokalizowanego w chromosomie 3 i zbudowanego z czterech egzonów. Peptyd LL-37 może łatwo ulec proteolizie, w wyniku czego powstaje wiele pochodnych, których miejscem występowania jest w głównej mierze skóra. Proteaza SCTE (ang. *stratum corneum tryptic enzyme*) prowadzi do wytworzenia peptydów KS30, KS22 i LL29; z kolei proteaza SCCE (ang. *stratum corneum chymotryptic enzyme*) generuje

dwa produkty: RK31 i KR20. Produkty pierwszego enzymu wykazują silną aktywność przeciwbakteryjną oraz niewielką aktywność chemotaktyczną, natomiast produkty drugiego najprawdopodobniej pełnią rolę w zwalczaniu komórek grzybów. Katelicyny zapobiegają infekcji po stosunku płciowym. Obecny w spermie enzym proteolityczny gastryny rozszczepia w kwaśnym środowisku pochwy prepropeptyd hCAP18 tak, iż powstaje produkt (ALL-38) niemal identyczny z peptydem LL-37, jednak na N-końcu zawiera dodatkową resztę alany [9].

Podobnie jak opisane wyżej peptydy przeciwdrobnoustrojowe, działanie bakteriobójcze katelicyn polega na zaburzaniu integralności błony komórkowej patogenów [9, 15, 21]. Opisano kilka mechanizmów uszkodzenia błon przez katelicyny [4, 25]. Tak zwany mechanizm „dywanowy” polega na odkładaniu się peptydów na powierzchni błony, co doprowadza, po przekroczeniu krytycznego stężenia, do jej uszkodzenia. Mechanizm „klepek beczki” (ang. *barrel stave*) polega na odkładaniu się peptydów w błonie w sposób prostopadły do jej płaszczyzny – jak klepki w beczce. Części hydrofobowe katelicyn skierowane są na zewnątrz i oddziałują z lipidami, z kolei części hydrofilowe zwrócone są do wnętrza tworzącego się kanału, co umożliwia wypływ składników cytoplazmy z komórki. Ostatni mechanizm, zwany mechanizmem porów toroidalnych, polega na oddziaływaniu części hydrofobowej katelicyn z lipidami, a części hydrofobowych z fosfolipidami [4, 9].

Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że właściwe wykorzystanie katelicyn lub odpowiednia stymulacja ich endogennej biosyntezy w organizmie, może przyczynić się do zniwelowania zagrożenia ze strony chorobotwórczych bakterii [5, 22, 23, 26, 27] oraz grzybów [28]. Infekcje *C. albicans* są istotnym problemem epidemiologicznym, a około połowa populacji to stali nosiciele tego grzyba. W fizjologicznych warunkach *C. albicans* jest zwykle niegroźny, jednak zakażenie u pacjentów z chorobami nowotworowymi skutkuje średnio 30% śmiertelnością. Leczenie infekcji wywołanych tym grzybem bywa nieskuteczne, gdyż odnotowywane są coraz liczniejsze przypadki narastającej oporności na stosowane leki [29]. Dlatego niezwykle istotne jest badanie możliwości usuwania tego zagrożenia nie poprzez bezpośrednio działające środki farmakologiczne, ale przez stymulację własnego układu immunologicznego pacjenta. Ostatecznym efektem tego procesu jest m.in. katelicyna LL-37 [24, 26, 27]. Jej produkcja w organizmie nasila się pod wpływem czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor 1*). Ten z kolei wytwarzany jest na skutek stymulacji komórek jelit przez

komensalne bakterie, pod wpływem L-mimozyny [27]. L-mimozyna to naturalny metabolit rośliny *Leucaena leucocephala*.

Odmianą peptydów należących do katelicydyn są protegryny. Zbudowane z 16 do 18 aminokwasów, pochodzą z leukocytów wieprzowych i są bogatymi w cysteinę białkami kationowymi. Silniej niż defensyny pochodzące od człowieka hamują rozwój *Chlamydia trachomatis*, a najsilniejsza ze znanych protegryn, protegryna-1, działa bakteriostatycznie na dwóinkę rzeżączki [7].

Wykorzystanie AMP w terapii

Ze względu na wysoką skuteczność peptydów przeciwdrobnoustrojowych w walce z patogenami, liczne firmy farmaceutyczne podjęły wysiłki zmierzające do wprowadzenia na rynek zawierających je preparatów (tabela 2). Potencjalne zastosowanie AMP w terapii opiera się na jednym z następujących założeń [7, 17, 19]:

- mogą pełnić funkcję samodzielnych leków zwalczających drobnoustroje (monoterapia). W takiej postaci mogą stanowić alternatywę dla stosowanych dotychczas antybiotyków, na które rozwinęła się oporność wśród mikroorganizmów;
- mogą zostać wykorzystane w skojarzeniu z antybiotykami i w sposób synergistyczny nasilać ich działanie przeciwbakteryjne;
- działają immunomodulująco – poprzez oddziaływanie z receptorami Toll, regulując w ten sposób ekspresję cytokin (np. IL-8) lub też wpływając na ekspozycję białek adhezyjnych;

- chronią przed wstrząsem septycznym i innymi powikłaniami infekcji poprzez neutralizację endotoksyn bakteryjnych.

Biosynteza AMP do celów farmakologicznych może stwarzać pewne problemy. Ponadto, trudno jest przewidzieć interakcję nowo projektowanych AMP z komórkami eukariotycznymi i białkami pozakomórkowymi, takimi jak cytokiny. Problemem jest też wydajny transport substancji czynnej, mającej postać złożonych peptydów, do miejsca docelowego [6, 7, 30]. W naturalnych warunkach AMP są zwykle syntezowane dokładnie w miejscu działania np. przez komórki nabłonka.

Jak przedstawiono w tabeli 2, spośród prezentowanych preparatów najbardziej zaawansowane są prace nad lekami Enfuvirtide (T-20), Daptomycin i Pexiganam. Pierwszy jest cennym lekiem antyretrowirusowym stosowanym w leczeniu zakażeń wirusem HIV. Natomiast dwa kolejne mogą przyczynić się do zmniejszenia ryzyka negatywnych następstw zakażeń bakteryjnych. Lekami o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym mogą stać się preparaty firmy Demagen (P-113 i D2A21).

Poza preparatami opisanymi w tabeli 2 istnieją też inne peptydy przeciwdrobnoustrojowe, które mogą pełnić zupełnie inne funkcje terapeutyczne. Należą do nich peptydy pozwalające na hamowanie wzrostu guzów nowotworowych. Magainina 2 (o sekwencji aminokwasowej GIGKFLHSACK-FGKAFVGEIMNS), wpływająca na przepuszczalność błony komórkowej, wykazuje skuteczność w zwalczaniu komórek nowotworowych o pochodzeniu zarówno hematologicznym, jak i guzów

Tabela 2. Zestawienie przykładów preparatów, które znajdują się na różnych etapach badań wraz z ich potencjalnym zastosowaniem [4, 6, 7, 10].

Table 2. Examples of AMPs-containing drugs under different stages of investigations and their potential use [4, 6, 7, 10].

Nazwa preparatu	Producent	Zastosowanie	faza badań klinicznych
Pexiganam	Genaera (USA)	leczenie infekcji w przypadku stopy cukrzycowej	III
Neuprex	Xoma Corp. (USA)	meningokokowe zapalenie opon mózgowych	III (2006 r. otrzymanie statusu leku sierocowego w UE)
MBI-594AN	Micrologic Biotech. (Kanada)	miejscowe zastosowanie w trądziku, atopowe zapalenie skóry	II
MBI-226	Micrologic Biotech. (Kanada)	infekcje wywołane użytkowaniem cewnika	II
P-113	Demegen (USA)	grzybica jamy ustnej, szczególnie u pacjentów z HIV, zapalenie śluzówki	II
Heliomycin	Entomed (Francja)	zakażenie wsierdza bakteriami G(+)	badania przedkliniczne
Daptomycin	Cubist Pharmaceut. (USA)	sepsa, zakażenia układu moczowego, skóry, zapalenia wsierdza	III
Enfuvirtide (T-20)	Trimeris, Roche (USA/Szwajcaria)	inhibitor fuzji wirusa HIV z komórką	zakończona faza III (2003)
Isegranin (IB-36)	Intrabiotics (USA)	zapalenie śluzówki (podanie doustne) i infekcje płuc przy mukowiscydozie (inhalacje)	II
Cytolex (MSI-78)	Genaera Corp. (USA)	leczenie infekcji w przypadku stopy cukrzycowej	badania przedkliniczne/I (2017 r.)
Ambicin (Nisin)	Nutrition 21 (USA)	antybiotyk, który pozwala na skuteczne leczenie zakażeń prątkami oraz wrzodów żołądka wywołanych przez <i>H. pylori</i>	badania przedkliniczne
D2A21	Demegen (USA)	zakażone rany po oparzeniach	III (2017 r.)
Lactoferricin-B	Morinaga Milk Industry Company (Japonia)	preparat do leczenia raka płaskokomórkowy głowy i szyi (HNSCC), lek zwalczający grzyby z rodzaju <i>Candida</i>	badania przedkliniczne

litych. Podobny mechanizm działania oraz aktywność wykazują peptydy: chryzofsyna 1 (sekwencja aminokwasów: FFGWLIKGAIHAGKAIHGLI) oraz cekropina B (sekwencja aminokwasów: KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL) [10]. Same defensyny, poza zastosowaniem terapeutycznym w nowotworach, mogą również stanowić markery procesu kancerogenezy. Na przykład poziom defensyny HβD1 (ang. *human beta-defensin 1*) ulega podwyższeniu w surowicy pacjentów z rakiem płuca, natomiast jej poziom w tkance nowotworowej zdecydowanie spada, w porównaniu do tkanek prawidłowych, w raku nerki oraz prostaty [19].

Przykłady AMPs zwierząt o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym

Od lat trwają poszukiwania zmierzające do izolacji nowych AMP, które byłyby skuteczniejsze i mniej toksyczne niż obecnie stosowane antybiotyki polipeptydowe. Wśród potencjalnych źródeł takich peptydów bardzo często brane są pod uwagę zwierzęta, zwłaszcza przedstawiciele gatunków endemicznych – charakterystykę wybranych przykładów podano poniżej. AMP o dużym potencjale terapeutycznym wykryto także w organizmach królików, owiec czy też ludzi. Katelicydyna królika CAP-18 oraz katelicydyna owcy SMAP29, w stężeniu 10 µg/ml, zabijają pałeczki ropy błękitnej w czasie od 15 do 90 minut. Z kolei ludzka β-defensyna DEFB118 niszczy pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) w ciągu 15 minut [9].

AMPs pochodzące z warana

Nietypowym źródłem związków przeciwbakteryjnych może być krew waranów z Komodo (*Varanus komodoensis*). Krew tych gadów zawiera liczne kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (CAMPs), które są w ich organizmie niezbędne ze względu na tryb odżywiania i bardzo wysokie narażenie na częste infekcje bakteryjne. Bishop i wsp. zidentyfikowali 48 nowych peptydów CAMPs. Każdy z nich wykazywał homologię struktury fragmentu histonów (głównie H1, ale także H2B oraz H3). Spośród przebadanych CAMPs siedem (VK6, 10, 11, 12, 13, 14 i 25) wykazywało wysoką skuteczność bakteriobójczą zarówno względem Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, jak i Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus* [31, 32]. Wartości EC50 badanych peptydów były stosunkowo niskie dla wszystkich peptydów, a w przypadku VK 10, 12 i 14 było niższe niż dla peptydu referencyjnego (LL-37). Z kolei przy analizie *P. aeruginosa* tylko VK 12 miał stężenie dla EC50 niższe niż dla LL-37, natomiast dla VK

10, VK 6 i VK 11 wielkości stężeń były dość wysokie. Oznacza to, że analizowane peptydy są zdecydowanie skuteczniejsze w zwalczaniu Gram-dodatnich *S. aureus* niż Gram-ujemnych *P. aeruginosa* [31]. Warto dodać, że pod wpływem stymulowania czynnikiem LPS następuje wzrost stężenia badanych peptydów w osoczu [31].

Powyższe badania udowodniły, że peptydy wykazujące wysoką homologię strukturalną z histonami mogą pełnić istotną rolę w zwalczaniu infekcji bakteryjnych [31, 33]. Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące na obecność ludzkich histonów H2A i H2B w łożysku w celu ochrony przed pałeczkami okrężnicy [33]. Również histony H1 mogą być wykorzystywane przez komórki ludzkie jako czynniki do zwalczania bakterii Gram-ujemnych [4].

AMP pochodzące z pandy wielkiej

Zupełną nowością w leczeniu zakażeń bakteriami wielolekoopornymi jest zastosowanie katelicydyn. Przykładem jest katelicydyna-AM, izolowana z krwi pandy wielkiej (*Ailuropoda melanoleuca*). W przeprowadzonych badaniach udowodniono, że jest ona w stanie niszczyć bakterie, jak również komórki grzybów zdecydowanie szybciej niż inne środki lecznicze. Katelicydyna-AM, zbudowana z 38 aminokwasów, jest syntetyzowana przez komórki układu immunologicznego pand, jednak ze względu na swoją dość prostą strukturę, istnieje możliwość syntezy laboratoryjnej tego peptydu [34].

Yan i wsp. przeprowadzili badania, które wykazały, że zastosowanie katelicydyny-AM w stężeniach stanowiących 2-, 4- lub 10-krotność minimalnego stężenia hamującego (MIC) powoduje całkowitą eliminację komórek gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) w ciągu 60 minut, podczas gdy zastosowana jako antybiotyk kontrolny klindamycyna potrzebuje 6 godzin. Mechanizm działania katelicydyny-AM opiera się na wiązaniu ze ścianą i błoną komórkową bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Jak wspomniano wyżej, podstawowym ograniczeniem zastosowania peptydowych antybiotyków w praktyce klinicznej jest brak optymalnej postaci farmaceutycznej. W związku z tym katelicydyna-AM może być zastosowana jako składnik czynny preparatów antyseptycznych, do oczyszczania pomieszczeń laboratoryjnych czy pomieszczeń szpitalnych [34].

AMP pochodzące z diabła tasmańskiego

Występujące u diabła tasmańskiego (*Sarcophilus harrisii*) katelicydyny zapewniają mu odporność na liczne szczepy bakterii patogennych [35]. Jest na nie stale narażony, gdyż młode osobniki, rodząc się na bardzo wczesnym etapie rozwoju – podobnie jak inne torbacze – mają kontakt z silnie skontaminowaną torbą lęgową, a po jej opuszczeniu

z podziemną norą. Aby wspomagać ich nie w pełni rozwinięty układ immunologiczny, konieczne jest przenikanie substancji z organizmu matki. Z tego względu torbacze są doskonałym obszarem badań pod kątem nowych, skutecznych AMPs [36]. W genomie diabłów tasmańskich zlokalizowano geny kodujące sześć różnych katelicydyn: Saha-CATH1 – Saha-CATH6 [37].

Każdy z 6 genów znajduje się w chromosomie 2, jest zbudowany z czterech egzonów, a powstałe w wyniku ekspresji tych genów pre-propeptydy mają wielkość od 154 do 172 aminokwasów. W skład cząsteczki wchodzi: peptyd sygnałowy (21–27 aminokwasów), silnie konserwatywna domena kateliny (85–95 aminokwasów) i zmienna domena przeciwdrobnoustrojowa (20–37 aminokwasów). Dojrzały peptyd w natywnej postaci jest strukturą silnie kationową. Ze względu na magazynowanie katelicydyn w ziarnistościach neutrofilii, wykryto obecność wszystkich sześciu we krwi, surowicy i w węzłach chłonnych diabłów tasmańskich. Ich stężenia były bardzo różne w poszczególnych tkankach, np. Saha-CATH3, 5 i 6 występowały w dużych ilościach w śledzionie, a Saha-CATH1 i 4 najczęściej wykrywano we krwi [35].

Ciekawy jest też fakt, iż torby lęgowe diabłów w czasie laktacji i poza tym okresem mają zupełnie inny skład mikroflory. Ilość bakterii z rodziny *Leptotrichiaceae* w obu przypadkach ulega największym wahaniom i u diabłów nie produkujących mleka sięga 20,9% wszystkich zidentyfikowanych bakterii, a u zwierząt w okresie laktacji jedynie 0,4%. Dla *Porphyromonas* sp. wartości te to 4,5% przy braku laktacji w porównaniu z 0,3% w jej toku, dla bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* 1,7% w porównaniu do 0,1%, a dla *Parvimonas* 1,0% w porównaniu z 0,2%. Z kolei częstość występowania *Cetobacterium* sp. wzrasta z 1,9% dla zwierząt poza okresem laktacji do 10,9% w okresie laktacji [35].

W badaniach nad aktywnością badanych katelicydyn diabłów tasmańskich wykazano, iż Saha-CATH 1, 2 i 4 nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec badanych szczepów patogennych przy zastosowaniu stężenia powyżej 64 µg/ml. Saha-CATH 3 wykazuje specyficzną aktywność przeciwgrzybiczą względem *Cryptococcus neoformans*, natomiast Saha-CATH 6 wykazuje właściwości bakteriobójcze w stosunku do niektórych gatunków *Streptococcus* oraz *Enterococcus faecalis* opornych na wankomycynę. Spośród badanych związków najszersze spektrum bakteriobójcze wykazuje Saha-CATH 5: udowodniono jego skuteczność zarówno wobec wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, a zwłaszcza szczepów opornych na wankomycynę (VRE) oraz metycylinę (MRSA) [37]. Dalsze analizy wykazały, że w przypadku peptydów Saha-CATH5 i 6 nie zaob-

serwowano toksycznego wpływu na komórki eukariotyczne w stężeniach sięgających 250 µg/ml [37].

Fagmidy

Nowoczesną formą walki z bakteriami opornymi na antybiotyki mogą się okazać fagmidy. Są to zmodyfikowane bakteriofagi M13, których genomy zawierają fragmenty plazmidów z wklonowanymi sekwencjami kodującymi AMP. Po zainfekowaniu docelowej komórki następuje ekspresja genów kodujących AMP, co prowadzi do zahamowania czynności życiowych bakterii, nie doprowadzając jednak do lizy jej komórki, a tym samym zagrożenia posocznicy. Co istotne, nie zaobserwowano dotychczas przypadków oporności na tę formę terapii. W 2015 r. skonstruowano fagmidy skutecznie niszczące komórki *Escherichia coli*, a trwające badania zmierzają do uzyskania podobnie efektywnych cząsteczek względem *Clostridium difficile* i *Vibrio cholerae* [38, 39].

Podsumowanie

Rozwijająca się oporność na antybiotyki wśród mikroorganizmów chorobotwórczych jest coraz bardziej palącym problemem i konieczne jest jej przeciwdziałanie. Katelicydyny oraz defensyny są niezwykle istotnymi czynnikami, które chronią organizmy roślin i zwierząt przed patogenami. Katelicydyny są bardzo skuteczne w niszczeniu patogenów i być może będą mogły być stosowane jako leki przeznaczone do terapii ludzi. Wiele niedostrzeganych i niedocenianych substancji, surowców i związków chemicznych może okazać się bardzo skuteczną bronią w walce z zakażeniami takimi bakteriami jak MRS (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) lub VRE (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*). Konieczne są zakrojone na szeroką skalę badania, które pozwoliłyby zidentyfikować nowe źródła AMPs, jak i opisać ich korzystne właściwości. Być może w przyszłości możliwe okaże się stymulowanie produkcji endogennych AMPs w przypadku wystąpienia infekcji, a nawet wprowadzenie, z użyciem technik terapii genowej, genów kodujących AMPs i ich ekspresja bezpośrednio w organizmie pacjenta.

Otrzymano: 2019.02.04 · Zaakceptowano: 2019.02.11

Piśmiennictwo

1. Fletcher S.: Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environ. Health Prev. Med.* 2015, 20(4): 243–252.
2. Thabit A.K., Crandon J.L., Nicolau D.P.: Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin. Pharmacother.* 2015, 16(2): 159–177.

3. Nolte O.: Antimicrobial resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. *Protein Pept. Lett.* 2014, 21(4): 330–335.
4. Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2008, 62: 694–707.
5. Ageitos J.M., Sanchez-Perez A., Calo-Mata P., Villa T.G.: Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 133: 117–138.
6. da Cunha N.B., Cobacho N.B., Viana J.F., Lima L.A., Sampaio K.B., Dohms S.S., Ferreira A.C., de la Fuente-Nunez C., Costa F.F., Franco O.L., Dias S.C.: The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today* 2017, 22(2): 234–248.
7. Wiechula B.E., Tustanowski J.P., Martirosian G.: Peptydy antydnobnoustrojowe. *Wiad. Lek.* 2006; 59(7–8): 542–547.
8. Hancock R.E.W., Chapple D.S.: Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(6): 1317–1323.
9. Wódz K., Brzezińska-Błaszczak E.: Katelicyny – endogenne peptydy przeciwdobnoustrojowe. *Post. Bioch.* 2015, 61(1): 93–101.
10. Deslouches B., Di Y.P.: Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget.* 2017, 8(28): 46635–46651.
11. Żyłowska M., Wysznińska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* 2011, 50(3): 223–234.
12. Wilmes M., Sahl H.-G.: Defensin-based anti-infective strategies. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014, 304(1): 93–99.
13. Vriens K., Cammue B.P., Thevissen K.: Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules* 2014, 19(8): 12280–12303.
14. Mattar H., Almelhar H.A., Yacoub H.A., Uversky V.N., Redwan E.M.: Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016, 28: 95–111.
15. Malanovic N., Lohner K.: Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016, 9(3): 59 (doi:10.3390/ph9030059).
16. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M.: Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid. Res.* 2012, 51(2): 149–177.
17. Niedzwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2008, 62: 524–529.
18. Zhao L., Lu W.: Defensins in innate immunity. *Curr. Opin. Hematol.* 2014, 21(1): 37–42.
19. Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., Herfs M.: Defensins: ‘Simple’ antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015, 26(3): 361–370.
20. Diamond G., Kaiser V., Rhodes J., Russell J.P., Bevins C.L.: Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2000, 68(1): 113–119.
21. Kościuczek E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E.: Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39(12): 10957–10970.
22. Duplantier A.J., van Hoek M.L.: The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front. Immunol.* 2013, 4: 143 (doi: 10.3389/fimmu.2013.00143).
23. Dürr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1758(9): 1408–1425.
24. Fabisiak A., Murawska N., Fichna J.: LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol. Rep.* 2016, 68(4): 802–808.
25. Ramos R., Silva J.P., Rodrigues A.C., Costa R., Guardão L., Schmitt F., Soares R., Vilanova M., Domingues L., Gama M.: Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides* 2011, 32(7): 1469–1476.
26. Lozeau L.D., Grosha J., Kole D., Prifti F., Dominko T., Camesano T.A., Rolle M.W.: Collagen tethering of synthetic human antimicrobial peptides cathelicidin LL37 and its effects on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Acta Biomater.* 2017, 52: 9–20.
27. Khindoli D., Pacor S., Benincasa M., Scocchi M., Gennaro R., Tossi A.: The human cathelicidin LL-37 – a pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1858(3): 546–566.
28. Bondaryk M., Staniszevska M., Zielińska P., Urbańczyk-Lipkowska Z.: Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. *J. Fungi (Basel)* 2017, 3(3): E46 (doi: 10.3390/jof3030046).
29. Teoh F., Pavelka N.: How chemotherapy increases the risk of systemic candidiasis in cancer patients: current paradigm and future directions. *Pathogens* 2016, 5(1): doi: 10.3390/pathogens5010006.
30. Nordström R., Malmsten M.: Delivery systems for antimicrobial peptides. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017, 242: 17–34.
31. Bishop B.M., Juba M.L., Russo P.S., Devine M., Barksdale S.M., Scott S., Settlege R., Michalak P., Gupta K., Vliet K., Schnur J.M., van Hoek M.L.: Discovery of novel antimicrobial peptides from *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) by large-scale analyses and de-novo-assisted sequencing using electron-transfer dissociation mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2017, 16(4): 1470–1482.
32. Chung E.M., Dean S.N., Propst C.N., Bishop B.M., van Hoek M.L.: Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017, 3: 9 (doi: 10.1038/s41522-017-0017-2).
33. Kawasaki H., Iwamuro S.: Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug Targets* 2008, 8(3): 195–205.
34. Yan X., Zhong J., Liu H., Liu C., Zhang K., Lai R.: The cathelicidin-like peptide derived from panda genome is a potential antimicrobial peptide. *Gene* 2012, 492(2): 368–374.
35. Peel E., Cheng Y., Djordjevic J.T., Fox S., Sorrell T.C., Belov K.: Cathelicidins in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Sci. Rep.* 2016, 6: 35019 (doi: 10.1038/srep35019).
36. Wang J., Wong E.S., Whitley J.C., Li J., Stringer J.M., Short K.R., Renfree M.B., Belov K., Cocks B.G.: Ancient antimicrobial peptides kill antibiotic-resistant pathogens: Australian mammals provide new options. *PLoS One* 2011, 6(8): e24030 (doi: 10.1371/journal.pone.0024030).
37. Peel E., Cheng Y., Djordjevic J.T., Kuhn M., Sorrell T., Belov K.: Marsupial and monotreme cathelicidins display antimicrobial activity, including against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 2017, 163(10): 1457–1465.
38. Farr R., Choi D.S., Lee S.W.: Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2014, 10(4): 1741–1750.
39. Krom R.J., Bhargava P., Lobritz M.A., Collins J.J.: Engineered phagemids for nonlytic, targeted antibacterial therapies. *Nano Lett.* 2015, 15(7): 4808–4813.