

## Neutrophil-derived host-defence proteins and peptides in human and animal therapy

Wessely-Szponder J., Bobowiec R., Division of Pathophysiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The purpose of this article was to present a novel approach in human and animal therapy. Antimicrobial proteins and peptides isolated from neutrophils are small molecules with broad spectrum activity against bacteria, fungi and viruses. This new therapeutic concept involves the use of host-derived, natural antimicrobial peptides not only as bactericidal, antifungal and antiviral agents but also as immunomodulatory factors. These factors can exert both pro-inflammatory and anti-inflammatory activity depending on clinical status of the patient. Molecules of the primary interest are defensins and cathelicidins which are present in high concentration in human and animal neutrophils. Due to the increasing problem of bacterial resistance to chemotherapeutics the possible use of host-derived antimicrobial peptides as therapeutics can be very promising. The biological activity of cathelicidins is not species restricted so they are most probable candidate for employment in the clinical use. The most likely source of cathelicidins are porcine neutrophils and their synthetic analogues.

**Keywords:** defensins, cathelicidins, lactoferrin, therapy, porcine neutrophils.

### Białka i peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Żywe organizmy są bezustannie narażone na szkodliwe działanie środowiska, w tym zakaźnych czynników chorobotwórczych. Pomimo tych niekorzystnych warunków, egzystują one bez nieustannego zapadania na różne choroby. Rośliny i zwierzęta w toku ewolucyjnego rozwoju wykształciły szereg mechanizmów obronnych, które wciąż ulegają udoskonalaniu, zapewniając ochronę zarówno za pośrednictwem mechanizmów odporności wrodzonej, jak i nabytej (1). Istotny element tej obrony stanowią naturalne peptydy obronne organizmu, nazywane peptydami przeciwdrobnoustrojowymi albo bakteriobójczymi (antimicrobial peptides), oraz białka o właściwościach bójczych (2).

Do komórek biorących udział w obronie organizmu przed patogenami należą neutrofile. Neutrofilowe fagosomy zawierają liczne czynniki antybakteryjne mające znaczący udział w odporności wrodzonej, w tym substancje o działaniu bójczym na drobnoustroje, takie jak reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNI) czy też uwalniane z ziarnistości enzymy. Oprócz wymienionych, neutrofile wytwarzają wiele peptydów

## Neutrofilowe obronne białka i peptydy w leczeniu zwierząt i ludzi

Joanna Wessely-Szponder, Ryszard Bobowiec

z Zakładu Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

przeciwdrobnoustrojowych, które mogą ulegać ekspresji konstytutywnej lub w odpowiedzi na czynniki patogene, takie jak np. lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych (LPS, endotoksyna) bądź mediatorzy zapalenia (IL-6 i TNF $\alpha$ ; 3).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są ważnym i efektywnym składnikiem odporności wrodzonej i są rozważane jako alternatywa dla konwencjonalnych antybiotyków (4). Zostały one odkryte na początku lat 80. ubiegłego wieku u żab i ropuch. Obecnie znana jest sekwencja około 1200 peptydów przeciwdrobnoustrojowych (5). Większość peptydów przeciwdrobnoustrojowych ma podobne cechy: małe rozmiary, ładunek kationowy i naturę amfipatyczną. Opierając się na tych właściwościach u ssaków, wyodrębniono grupy tych peptydów – defensyny i katelicydyny. Na szczególną uwagę zasługują katelicydyny, które, w przeciwieństwie do wielu innych czynników (w tym wolnych rodników), pozostają stabilne w wysięku nawet przez kilka dni (3).

W toku ewolucji peptydy przeciwdrobnoustrojowe uzyskały wiele funkcji oprócz szerokiego spektrum bakteriobójczego. Opisano działanie bójcze na grzyby i wirusy niektórych peptydów neutrofilowych u ssaków. Pozostałe funkcje obejmują chemotaksję, uwalnianie histaminy z komórek tucznych, stymulację gojenia się ran i apoptozę. Aktywność chemotaktyczną na limfocyty T wykazano w przypadku defensyn  $\alpha$  ludzi: HNP-1 i HNP-2; świńskiej PR-39 w odniesieniu neutrofilu, a ludzkiej LL-37 zarówno dla limfocytów T, jak i neutrofilu. Szczególnie interesującą zależność odkryto pomiędzy IL-8 i defensynami  $\alpha$ , prowadzącą do zwiększenia rekrutacji leukocytów i eliminacji drobnoustrojów. Uwalniana przez komórki nabłonkowe w odpowiedzi na patogen IL-8 działa chemotaktycznie na neutrofile i stymuluje uwalnianie defensyn  $\alpha$ , które mogą następnie atakować drobnoustroje, jednocześnie aktywując limfocyty T i indukując syntezę IL-8. To wzajemne oddziaływanie stanowi powiązanie pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą. Efektory odporności wrodzonej (np. cytokiny) pełnią instruującą rolę dla wysoce swoistych limfocytów – składników odpowiedzi nabytej układu immunologicznego (6, 7).

### Niektóre neutrofilowe białka obronne

#### Kalprotektyna

Białkiem obronnym pochodzącym z cytozolu granulocytów obojętnochłonnych jest kalprotektyna. Jest ona uwalniana z rozpadłych neutrofilu po ich obumarciu. Kalprotektyna ma właściwości bakteriobójcze spotęgowane wiązaniem cynku, co pozbawia mikroorganizmy tego pierwiastka. Ponadto reguluje cykl komórkowy, różnicowanie się komórek i interakcje pomiędzy cytoskieletem a błoną komórkową. Hamuje też wzrost fibroblastów i może indukować apoptozę w różnych komórkach gospodarza (2). Stężenie kalprotektyny w cytozolu wynosi 5–15 mg/ml i stanowi około 60% białka cytozolowego. Jest to heterodimer zawierający jeden łańcuch lekki (8 kDa) i dwa ciężkie (14 kDa; 8). Kalprotektynę wykryto u ludzi, szczurów, myszy, królików, owiec, bydła i świń (9). Znajduje się ona w komórkach, tkankach i płynach ustrojowych całego organizmu i wykrywana jest w osoczu, moczu, kale, płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie oraz płynie jam stawowych. Zwiększone stężenie kalprotektyny w osoczu pojawia się w wielu chorobach zakaźnych lub innych o podłożu zapalnym (10), takich jak marskość wątroby, mukopolisaccharidozę i rak jelita grubego. U prosiąt wzrost kalprotektyny nastąpił po doświadczalnym zakażeniu *E. coli* (8).

#### Laktoferyna

Laktoferyna należy do grupy transferyn, jest białkiem o masie 80 kDa, magazynowanym w ziarnistościach wtórnych neutrofilu. Działa ona bakteriostatycznie wiążąc jony Fe<sup>3+</sup>, które są niezbędne do życia bakterii. Oprócz tego wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, a także przeciwwirusową przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV), wirusowi polio, rotawirusom, wirusom herpes i HIV. Oprócz bezpośredniego działania bójczego na czynniki zakaźne laktoferyna wiąże się z komórkami gospodarza zmieniając ich aktywność, m.in. nasila fagocytozę neutrofilu i wpływa na uwalnianie cytokin, zwiększając poziom IL-6 i TNF $\alpha$ , a hamując IL-1 i IL-2 (2). Stężenie laktoferyny we

krwi jest zwykle bardzo niewielkie ( $<1 \mu\text{g/ml}$ ), pochodzi ona z degranulacji neutrofilów i rośnie w przebiegu zapalenia i zakażeń, tak jak ma to miejsce podczas *mastitis* i *metritis* u krów (11, 12; **ryc. 1**). Ponadto laktoferyna może ulegać rozszczepieniu na peptydy z N-końcem nazwane laktoferycynami, ze zdolnością do przenikania przez błonę komórkową bakterii i silniejszymi właściwościami bójczymi niż laktoferyna. Bydłęce laktoferycyny są znacznie silniejsze niż ludzkie, podczas gdy mysia laktoferyna zawiera dodatkowe reszty kwasowe na N-końcu, co uniemożliwia jej rozszczepienie do aktywnych laktoferycyn (12). Doustne podawanie laktoferyny myszom wzmagало sekrecję immunoglobulin IgA i IgG z kępek Peyera i śledziony (2). Przeprowadzone badania wykazały, że laktoferyna i laktoferycyna podawane doustnie zwierzętom wykazują działanie zwalczające zakażenia, w tym *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* i *Toxoplasma gondii* i obniżają liczbę bakterii *S. aureus* i *E. coli* w zakażeniach pęcherza moczowego u myszy (13).

### Białko bakteriobójcze zwiększające przepuszczalność (bactericidal/permeability-increasing protein – BPI)

Białko to o masie 55 kDa jest białkowym składnikiem neutrofilowych ziarnistości azurofilnych. Wiąże ono endotoksynę (LPS) i opsonizuje bakterie Gram-ujemne. Jest ono aktywne przeciwko *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella* spp. i *Enterobacter* spp. Należy mieć na uwadze, że niektóre bakterie Gram-ujemne, takie jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Serratia* są jednak odporne na jego działanie (2).

### Przykłady peptydów przeciwdrobnoustrojowych

#### Defensyny

U ssaków wykryto około 50 defensyn  $\alpha$  i 90 defensyn  $\beta$  magazynowanych w ziarnistościach neutrofilów i komórkach Panetha. Są one też wytwarzane przez monocyty i makrofagi, keratynocyty i komórki nabłonka układów oddechowego, pokarmowego, moczowego i rozrodczego. Wszystkie defensyny, pomimo różnorodnej sekwencji, mają pewne cechy wspólne: są kationowe, mikrobójcze i zawierają sześć wysoce konserwatywnych reszt cysteinowych, które tworzą trzy pary wewnątrzkomórkowych mostków dwusiarczkowych. W oparciu o homologiczne sekwencje i ciągłość sześciu konserwatywnych reszt cysteinowych defensyny ssaków zostały sklasyfikowane w trzech grupach: defensyny  $\alpha$ , defensyny  $\beta$  i defensyny  $\theta$ .

Peptydy te działają nie tylko mikrobójczo, ale również immunomodulująco (14).

U człowieka głównymi neutrofilowymi defensynami  $\alpha$ , obejmującymi 30–50% białkowej zawartości ziarnistości azurofilnych, są HNP-1, -2 i -3. W przeciwieństwie do ludzi neutrofile koni, świni i myszy nie zawierają defensyn  $\alpha$  (7). U człowieka zidentyfikowano cztery defensyny  $\beta$  – HBD-1, -2, -3 i -4, wśród których przykładowo HBD-2 uczestniczy w uwalnianiu histaminy i prostaglandyny D2 przez komórki tuczne. Ponadto  $\alpha$  defensyny działają silnie wirusobójczo szczególnie przeciw adenowirusom (15).

#### Katelicydyny

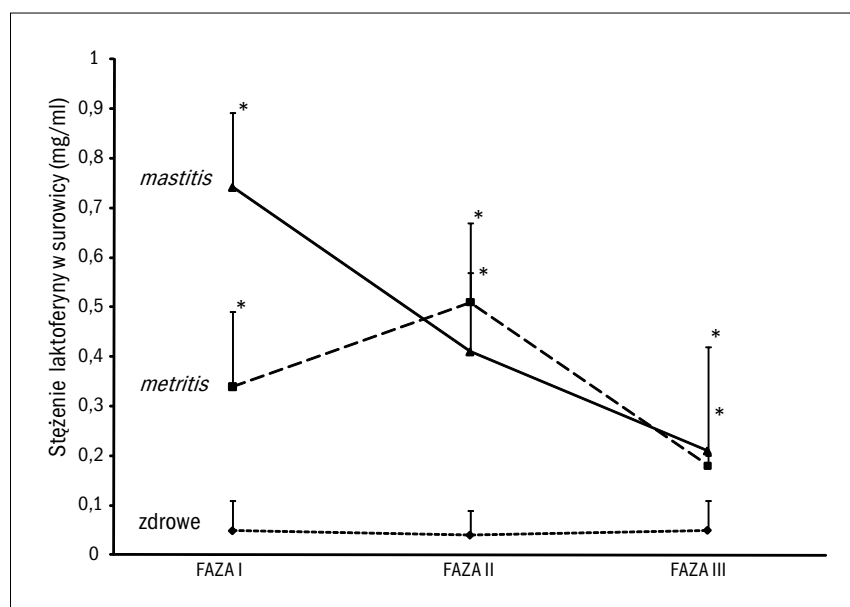
Katelicydyny (Kat), będące przedmiotem naszych badań, są zróżnicowaną grupą peptydów należącą do peptydów ochronnych organizmu. Zostały one rozpoznane u różnych gatunków ssaków: bydła, ludzi, małąp, myszy, szczurów, królików, świnek morskich, świni, owiec, kóz, koni i psów. Katelicydyny odkryto we wczesnych latach 90. ubiegłego wieku i nazwano ze względu na podobieństwo ich proregionów do kateliny, białka o masie 12 kDa pochodzącego z leukocytów świni. Do regionu katelinowego przyłączony jest antybakteryjny peptyd o zróżnicowanej strukturze, uwalniany przez trawienie enzymami proteolitycznymi. Ze względu na strukturę katelicydyny podzielono na cztery rodzaje: alfa-helikalne, o strukturze helikalnej wydłużonej, o strukturze pętli i beta-płaszczynowe (4).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są syntetyzowane w postaci trzydomenowego propeptydu z N-końcową sekwencją sygnałową, fragmentem anionowym oraz C-końcową dojrzałą kationową sekwencją

(1). Geny dla katelicydyn zawierają cztery eksony i trzy introny. Pierwsze 3 eksony kodują preproregion, podczas gdy miejsce odszczepienia i peptyd antybakteryjny o zróżnicowanej strukturze są kodowane przez czwarty ekson. Katelicydyny są kodowane jako prepropeptydy z klasycznym N-końcem dla przechowywania wewnątrz komórki. Ten anionowy prosegment może funkcjonalnie neutralizować peptyd kationowy i utrzymywać nieaktywną formę propeptydu podczas transportu wewnątrzkomórkowego i przechowywania zapobiegając toksyczności wewnątrzkomórkowej (4).

Konie, krowy, świni owce, kozy, świnki morskie należą do gatunków „polikatelicydynowych”, posiadających różne geny kodujące różne katelicydyny. Z kolei ludzie, mały, psy, króliki, myszy, szczury posiadają pojedynczy gen katelicydyny. Katelicydyny pełnią rolę ochronną w zakażeniach. Są bakteriobójcze dla bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, grzybów, pasożytów i pewnych wirusów, wykazują interakcje z LPS i indukują cytolizę (4). Katelicydyny uszkodzają naładowaną ujemnie błonę komórkową bakterii, do której przyłączają się elektrostatycznie, w odróżnieniu od błon komórkowych ssaków, które w większości mają ładunek neutralny (16).

W warunkach laboratoryjnych większość katelicydyn zabija szerokie spektrum mikroorganizmów przez zaburzenie integralności ich błon komórkowych. Ponadto mogą one odgrywać rolę w naprawie uszkodzonych tkanek i zamykaniu się ran przez promowanie rewaskularyzacji i epitelializacji w gojeniu się skóry. Jedną z katelicydyn świni – PR-39 (proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide) jest chemoaktywna dla neutrofilów w ilości 0,5–2  $\mu\text{M}$ ,



Ryc. 1. Zmiany stężenia laktoferyny (mg/ml) w surowicy krów w przebiegu *mastitis* i *metritis* (\* $p < 0,05$ ; 11)

choć nie wykryto jeszcze odpowiedzialnego za to receptora komórkowego (17).

Istotna jest również rola katelicydyn w regulacji procesów oksydacyjnych w organizmie. Reaktywne formy tlenu wytwarzane przez fagocyty są ważnym elementem obrony organizmu. Jednak wysokotokyczne wolne rodniki mogą powodować poważne uszkodzenia tkanek podczas procesu zapalnego, dlatego ważne jest, aby wytwarzanie i inaktywacja wolnych rodników były ściśle regulowane. Jednym z takich mechanizmów jest zmniejszanie aktywności oksydazy NADPH przez PR-39. Peptyd ten przyczynia się również do zmniejszenia adhezji naczyniowej leukocytów w uszkodzeniach niedokrwiennie-reperfuzyjnych.

Inne katelicydyny, np. probac 5, ograniczają uszkodzenie tkanek przez zahamowanie aktywności katepsyny L (17).

Katelicydyny wykazują interakcje z LPS, powodując zmniejszenie podatności na endotoksemię i wstrząs septyczny. Stwierdzono to na podstawie inkubacji króliczej CAP-18 z LPS przed iniekcją dootrzewnową endotoksyny oraz po zastosowaniu ludzkiej LL-37 w zwalczaniu objawów wstrząsu septycznego wywołanego *P. aeruginosa* (18).

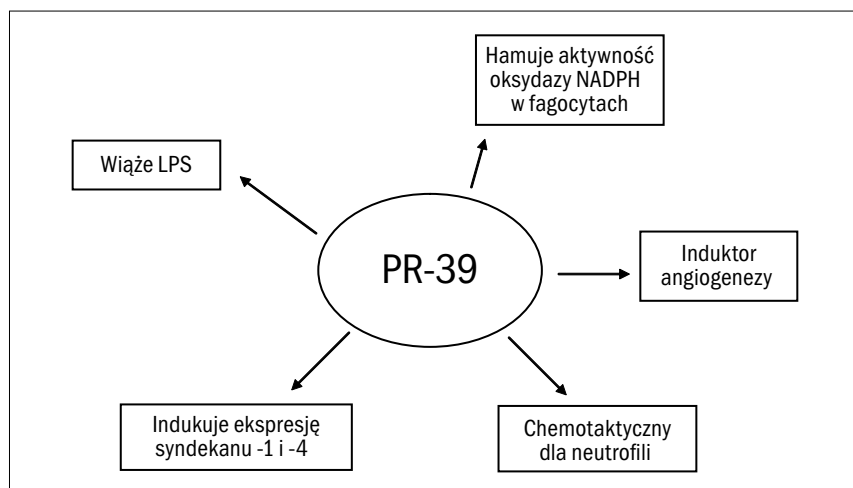
### Katelicydyny świń

Ssakami o najbardziej różnorodnym zestawie katelicydyn są świnie (17). Wykryto

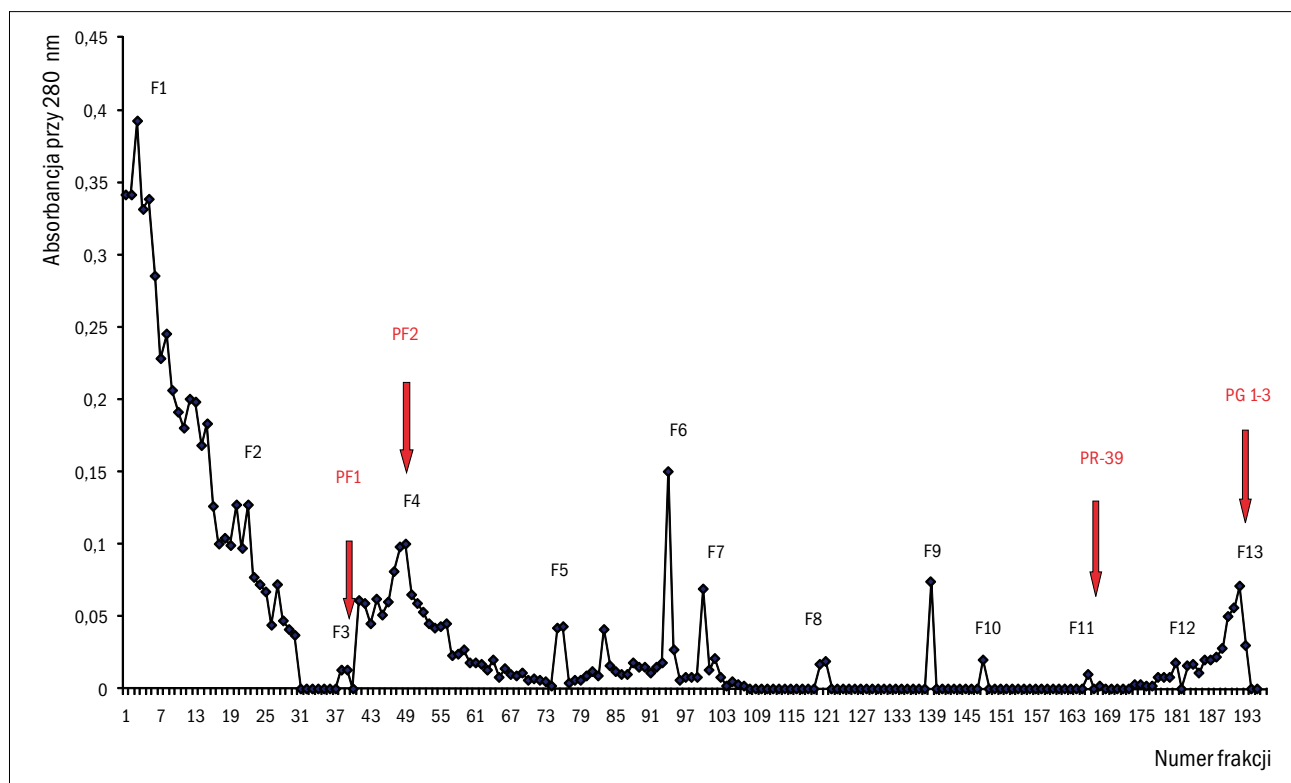
u nich następujące neutrofilowe peptydy przeciwustrojowe: bogate w prolinę i fenylenoalaninę profeniny PF-1 i -2 (4); peptyd PR-39 i protegryny od 1 do 5 (PG1-5; cysteine-rich protegrin 1-5) oraz peptydy mieloidalne (PMAP-23, PMAP-36, PMAP-37; 17).

Profeniny 1 i 2 są katelicydynami izolowanymi z leukocytów (19) i z tkanki płucnej (20). Są one aktywne przeciwko bakteriom Gram-ujemnym (19). Charakteryzują się strukturą helikalną wydłużoną oraz wysoką zawartością proliny (53%) i fenylenoalaniny (19%; 4).

PR-39 jest aktywny głównie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, wykazano, że jego stężenie w surowicy rośnie znacząco podczas salmonelozy. Ponadto ma szereg innych ważnych funkcji, jest m. in. specyficznym chemoatraktantem dla neutrofilii (19). Gromadzi się w okolicach ran, indukując ekspresję syndekanu -1 i -4 w komórkach mezenchymalnych. Syndekany są proteoglikanami ważnymi dla różnych mechanizmów naprawy tkanek i są związane z czynnikami wzrostowymi przyłączającymi się do receptora heparynowego. Należą do nich czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor – VEGF) i transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Działanie ich reguluje proliferację komórek i migrację w odpowiedzi na czynniki zapalne. PR-39 jest również induktorem angiogenezy w hodowlach komórkowych oraz *in*



Ryc. 2. Immunomodulujące działanie PR-39



Ryc. 3. Filtracja żelowa surowego ekstraktu antybakteryjnego w celu uzyskania frakcji zawierających poszczególne katelicydyny izolowane z neutrofilii świń, przeprowadzona na kolumnie z Sephadex G-50 w obecności 5% kwasu octowego, monitorowana przy długości fali 280 nm (24)

*vivo* w miokardium u myszy (21). Ponadto wiąże LPS, zapobiegając rozwinięciu się wstrząsu septycznego (19). Hamuje również aktywność oksydazy NADPH w fagocytach, co wskazuje na ważną biologicznie rolę w regulacji ostrego zapalenia, tak aby nie stanowiło ono zagrożenia dla organizmu (17; **ryc. 2**).

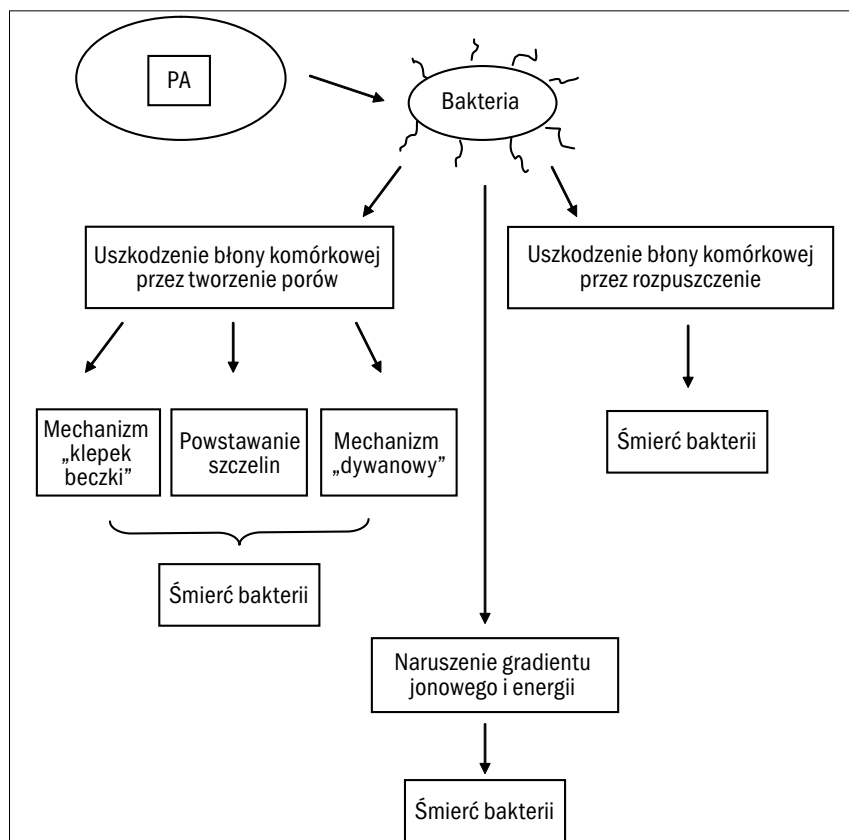
Protegryny (od PG-1 do PG-5) są uwalniane z neutrofilów i znajdują się w stężeniach bakteriobójczych w wysiękach ropnych. Mają pewne wspólne cechy, takie jak niewielkie rozmiary (16–18 aminokwasów), struktura  $\beta$  płaszczyznowa, ładunek kationowy i amfipatyczna natura. Najlepiej poznana protegryna 1 to 18-aminokwasowy peptyd izolowany z leukocytów świń, wykazujący szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego i rozważany jako potencjalny terapeutyk (22, 23).

Powyższe peptydy otrzymywane są z neutrofilów pochodzących z krwi świń i izolowane po rozdzieleniu frakcji za pomocą filtracji żelowej, metodą umożliwiającą równoczesne izolowanie peptydów PF, PR-39 i PG zarówno do celów badawczych, jak i zastosowania terapeutycznego (24; **ryc. 3**).

### Mechanizm działania i cytotoksyczność peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Peptydy działają obronnie przez bezpośredni efekt bójczy na bakterie, grzyby i wirusy (25). Większość peptydów przeciwdrobnoustrojowych wchodzi w interakcje z błoną komórkową bakterii przez uszkodzenie warstwy fosfolipidowej, powodując utratę ciągłości błon. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe zabijają mikroorganizmy w sposób związany z ich kationowym ładunkiem i strukturą. Kationowy ładunek umożliwia im przyczepienie się do składników anionowych powierzchni błony lipidowej bakterii, wirusów i pierwotniaków. Wiązanie to jest nieswoiste. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mają miejsce hydrofobowe zlokalizowane przeciwnie do miejsca kationowego. Ta amfipatyczna struktura umożliwia im wnikięcie przez błonę docelową (15). Powstają wówczas szczeliny jonowe, dochodzi do naruszenia gradientu energetycznego błony, prowadzącego do śmierci komórki bakteryjnej (7). Głównymi mechanizmami są tu tworzenie porów w błonie bakteryjnej albo rozpuszczanie błony w taki sposób jak przez detergent (15). Innym mechanizmem jest przenikanie przez błonę i oddziaływanie na jeden lub kilka anionowych celów wewnątrzkomórkowych (25).

Zniszczenie błony może nastąpić za pomocą szeregu mechanizmów; pierwszy z nich, tzw. mechanizm klepek beczki polega na kumulacji peptydów na kształt



Ryc. 4. Różne oddziaływania peptydów przeciwbakteryjnych na bakterie

klepek beczki, przy czym niepolarnie części zajmują lipidową część błony, a hydrofilowa wewnętrzna powierzchnia tworzy szczeliny. Drugi mechanizm polega na powstawaniu łączących się kanałów i tworzeniu w błonie komórki szczelin, wniskających do jej wnętrza. Trzeci to mechanizm „dywanowy”, gdy białka pokrywają szczelinę powierzchni błony, wywierając na nią nacisk, czego efektem jest jej dezintegracja (26; **ryc. 4**).

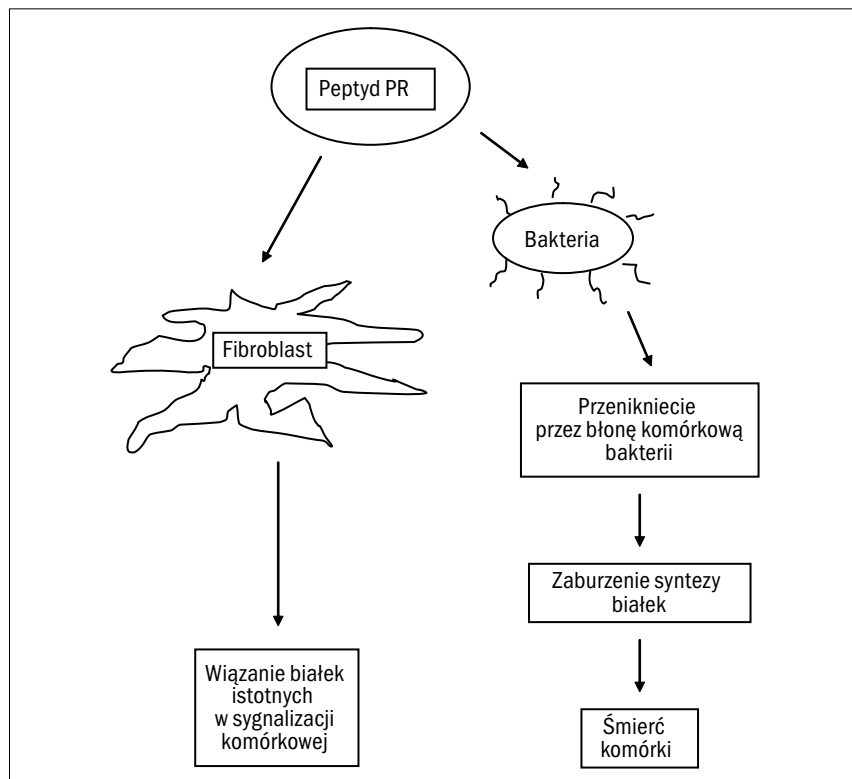
W wyniku tych oddziaływań dochodzi do zaburzeń przepuszczalności błony, gradientu jonowego i energetycznego, co powoduje liżenie komórek w ciągu kilku minut. Komórki gospodarza są odporne na ten proces, ponieważ mają bardziej złożony skład lipidów błonowych od komórek patogenów, które mają zabijać peptydy przeciwdrobnoustrojowe (7, 15).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe z grupy PR, w tym PR-39, działają inaczej, bez wytwarzania porów w błonie komórkowej. Bakterie wystawione na ich działanie na początku zmniejszają syntezę białek. Okazało się, że peptydy te penetrują przez błonę komórkową, wniskając do wnętrza komórek docelowych z następującą po tym niemożnością syntezy białek. W komórkach bakterii prowadzi to do śmierci, podczas gdy w fibroblastach i komórkach śródbłonna naczyniowego umożliwia wiązanie białek mających istotne znaczenie w sygnalizacji komórkowej (15; **ryc. 5**).

### Zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Przy terapeutycznym stosowaniu peptydów przeciwdrobnoustrojowych, tak jak w przypadku klasycznych antybiotyków, istnieje groźba wykształcenia się lekooporności czynników zakaźnych. Jednakże względnie niespecyficzny mechanizm ich działania pozwala uniknąć rozwinięcia się swoistej oporności u bakterii. Niektóre bakterie wykształciły wprawdzie system obronny dla częściowego uniknięcia destrukcji przez obniżenie ujemnego ładunku powierzchniowego i zmniejszenie powinowactwa do peptydów przeciwdrobnoustrojowych, pełna oporność nie rozwinęła się jednak nawet u takich patogenów, jak *Streptococcus pyogenes* czy *Staphylococcus aureus* przez tysiąclecia obcowania z tymi peptydami (22).

Z powodu wysokiej termostabilności (w 65 i w 80°C przez 30 min, a nawet po autoklawowaniu), oporności na wysokie stężenie soli i różnice w pH owcza katelicyna SMAP29 uznana została za obiecujący środek do konserwacji schłodzonych produktów mięsnych (27). Mieszanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych z owczych neutrofilów wywiera działanie bakteriostatyczne przeciwko *L. monocytogenes* w szynce, co stwarza możliwość jej wykorzystania jako produktu konserwującego naturalnego pochodzenia (28). Możliwym zastosowaniem jest również



Ryc. 5. Dwutorowy mechanizm działania peptydów przeciwbakteryjnych z grupy PR

krem do miejscowego stosowania u owiec na rany cięte i zadrapania (27).

Sz szczególnie obiecująca jest funkcja katelicydyn jako antybiotyków, z uwagi na brak rozwijania się lekooporności wśród badanych szczepów bakteryjnych. Aktualnie na etapie badań klinicznych są zastosowania katelicydyn w zakażonej stopie cukrzycowej (Pexiganan), meningokokowym zapaleniu opon mózgowych, zakażeniach będących powikłaniami po cewnikowaniu (Omiganan), trądziku, niedokrwinnym uszkodzeniu mięśnia sercowego i zakażeniach grzybiczych (22, 29). Katelicydyna IB-367 (syntetyczna) jest w trzeciej fazie prób klinicznych nad zastosowaniem w zapaleniu jamy ustnej i w drugiej fazie prób klinicznych jako aerozol przy zakażeniach układu oddechowego *P. aeruginosa*. Indolicydyna (Migenix) z kolei jest w trzeciej fazie prób klinicznych jako środek do sterylizacji miejsc cewnikowania. W fazie prób klinicznych znajduje się również szereg leków opartych na katelicydynach pochodzenia naturalnego, m.in. Isegran (IntraBiotics), pochodna protegryn świńskich do zwalczania zakażeń układu oddechowego u ludzi (29).

Syntetyczny peptyd Oct-CA(1-7)M pochodny cekropiny został uznany za skuteczny i spełniający normy bezpieczeństwa w leczeniu leiszmaniozy u psów. Ponadto dermaseptyny zastosowano na mysim modelu doświadczalnym, a dermaseptyny, cekropinymelitynę, poli-peptyd YY i gomezynę w badaniach *in vitro* (30).

Wprowadzenie peptydów jako alternatywnych środków terapeutycznych jest częściowo umotywowane małym rozmiarem cząstek w porównaniu z antybiotykami i białkami antybakteryjnymi, co sprawia, że mogą być podawane drogą kontaktową. Przez to podkreśla się wygodę stosowania i redukcję całkowitych kosztów leczenia. Dlatego badania w kierunku zastosowań peptydów terapeutycznych szczególnie koncentrują się na nowych drogach podawania. Obejmuje to drogę naskórną, elektroforezę przez naskórną, sonikację, inhalację, transferysomy i podawanie doustne. Pomimo pewnych barier, takich jak możliwe różnice pomiędzy działaniem *in vitro* i *in vivo*, interakcje w układzie pokarmowym, krążeniu, skórze i możliwa immunogenność, przyszłość nowych leczniczych peptydów jawi się obiecująco (16). Mogą one znaleźć zastosowanie w zwalczaniu zakażeń układowych (skóra, układy oddechowy, pokarmowy i moczowo-płciowy) jako element arsenału antyinfekcyjnego XXI wieku, a niektóre z nich są już na etapie prób klinicznych (27).

### Ograniczenia w zastosowaniu peptydów obronnych

Występujące w naturze peptydy kationowe charakteryzują się olbrzymią różnorodnością i szeregiem ważnych klinicznie działań. Prowadzone dotychczas z wielkim zaangażowaniem badania nad syntetycznymi peptydami przyniosły jednak umiarkowany sukces kliniczny. Jednym

z możliwych ograniczeń jest ich toksyczność. Badania kliniczne koncentrują się w związku z tym raczej na miejscowym niż ogólnym stosowaniu badanych preparatów. Ogólne stosowanie peptydów terapeutycznych wymaga wprowadzenia metod bardziej wybiórczego działania ograniczającego się, np. tylko do indukcji apoptozy lub degranulacji komórek tucznych. Kolejną wadą jest potencjalna wrażliwość na działanie proteaz. Stąd opracowywane są stabilniejsze roztwory i postaci leków (np. liposomy) lub chemiczne modyfikacje peptydów, aby stworzyć odporne na działanie proteaz (i/lub mniej toksyczne) cząsteczki. Kolejną przeszkodą jest wysoki początkowo koszt wytwarzania peptydów (25).

### Perspektywy rozwoju badań nad zastosowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w terapii

Kationowe peptydy wykazują, oprócz bezpośredniego wpływu na drobnoustroje, działanie immunomodulujące, zapewniające z jednej strony wzmoczenie odpowiedzi nieswoistej, z drugiej zaś wygaszenie nadmiernej reakcji organizmu w postaci wstrząsu septycznego. Immunomodulacja polega na modyfikowaniu ekspresji genów w monocytach i komórkach nabłonkowych, działaniu chemotaktycznym, indukowaniu odpowiedzi w postaci uwalniania chemotraktantów oraz wzmaganiu angiogenezy i gojenia się ran. Są to działania zarówno prozapalne, jak również zmierzające do wygaszenia procesu zapalnego, w zależności od stanu klinicznego i aktualnych potrzeb organizmu (25, 29).

### Piśmiennictwo

1. Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicydyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2008, **62**, 694-707.
2. Levy O.: Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. Leuk. Biol.* 2004, **76**, 909-925.
3. Shi, J., Ganz, T.: The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immun.* 1998, **66**, 3611-3617.
4. Ramanathan, B., Davis, E., Ross, Ch., Blecha, E.: Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microb. Infect.* 2002, **4**, 361-372.
5. Lai Y., Gallo R.: AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defence. *Trends Immunol.* 2009, **30**, 131-141.
6. Bowdish D., Davidson D., Scott M., Hancock R.: Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 1727-1732.
7. Gudmundsson G., Agerbeth B.: Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol. Meth.* 1999, **232**, 45-54.
8. Splichal I., Fagerhol M., Trebichavski I., Splichalova A., Schulze J.: The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiology* 2005, **209**, 681-687.
9. John B., Fagerhol M., Lyberg T., Prydz H., Naess-Andersen C., Dale I.: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 1997, **50**, 113-123.

10. Poullis A., Foster R., Mendall M., Fagerhol M.: Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *J. Gastrolog. Hepatol.* 2003, **18**, 756-762.
11. Bobowiec R, Wessely-Szponder J., Hola P.: Crosstalk between coagulation and inflammation in mastitis and metritis in dairy cows. *Acta Vet. Hung.* 2009, **57**, 283-293.
12. Brock J.: The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 2002, **80**, 1-6.
13. Yamauchi K., Wakabayashi H., Shin K., Takase M.: Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochem. Cell. Biol.* 2006, **84**, 291-296.
14. Lai Y., Gallo R.: AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009, **30**, 131-141.
15. Izadpanah A., Gallo R.: Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, **53**, 381-390.
16. Lien S., Lowman H.: Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 2003, **21**, 556-562.
17. Sang Y., Blecha F.: Porcine host defence peptides: Expanding repertoire and functions. *Develop. Comp. Immunol.* 2009, **33**, 334-343.
18. Hirata M., Shimomura Y., Yoshida M., Morgan J., Palings I., Wilson D., Yen M., Wright S., Larrick J.: Characterization of rabbit cationic protein with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect. Immun.* 1994, **62**, 1421-1426.
19. Zang G., Ross R., Blecha F.: Porcine antimicrobial peptides: New prospects for ancient molecules of host defence. *Vet. Res.* 2000, **31**, 277-296.
20. Wang Y., Walter G., Herting E., Agerberth B., Johansson J.J.: Antibacterial activities of the cathelicidins prophenin (residues 62 to 79) and LL-37 in the presence of a lung surfactant preparation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, **48**, 2097-2100.
21. Tomaszinsig L., Zanetti M.: The cathelicidins-structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005, **6**, 23-34.
22. Gallo R., Murakami M., Ohtake T., Zaiou M.: Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, **110**, 823-831.
23. Steinberg, DA., Hurst, M., Fujii, CA.: Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chem.* 1997, **41**, 1738-1742.
24. Wessely-Szponder J, Majer-Dziedzic B., Smolira A.: Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *J. Microbiol. Methods.* 2010, **83**, 8-12.
25. Hancock R.E.W., Sahl, H-G.: Antimicrobial and host-defence peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotech.* 2006, **24**, 1551-1557.
26. Wierchuła B., Tustanowski J., Martirosian G.: Peptydy antydrobnoustrojowe. *Wiad. Lek.* 2006, **59**, 542-547.
27. Anderson, R., Wilkinson, B., Yu, P-L.: Ovine antimicrobial peptides: new products from an age-old industry. *Austr. J. Agricult. Res.* 2004, **55**, 69-75.
28. Yu P-L. Van der Linden D., Sugiarto H., Anderson R.: Antimicrobial peptides isolated from the blood of farm animals. *Animal Prod. Sci.* 2010, **50**, 660-669.
29. McPhee, J.B., Hancock, R.E.W.: Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J. Pept. Sci.* 2005, **11**, 677-687.
30. Alberola J., Rodriguez A., Francino O., Roura X., Rivas L., Andreu D.: Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chem.* 2004, **48**, 641-643.

---

Dr Joanna Wessely-Szponder, Zakład Patofizjologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin