

Peptydy odpornościowe zwierząt

Zdzisław Gliński

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Zwierzęta pomimo ciągłej konfrontacji z różnorodnymi czynnikami środowiska zewnętrznego i wewnętrznego, wśród których najważniejszą rolę odgrywają czynniki obce dla organizmu, takie jak drobnoustroje i pasożyty, zachowują integralność i bronią się przed kolonizacją za pomocą mechanizmów, których celem jest przywrócenie zaburzonej homeostazy. Podstawowa strategia wykorzystywana przez wszystkie zwierzęta polega na rozpoznaniu i zniszczeniu lub eliminacji substancji uznanej za obcą. Dodatkowe strategie, które polegają na „uczeniu się” i na istnieniu „pamięci immunologicznej”, pojawiły się w miarę doskonalenia systemów obrony i ewoluowały wraz z pojawieniem się i rozwojem układu immunologicznego, osiągając optymalny rozwój u ssaków (1). W związku z tym pojawiło się pytanie o znaczeniu fundamentalnym odnośnie do podstaw warunkujących odporność u organizmów, które nie produkują przeciwciał i nie posiadają limfocytów T. Jedną z odpowiedzi były badania dotyczące polipeptydów odpornościowych zapoczątkowane u owadów holometabolicznych, uwarunkowań genetycznych, ich biosyntezy, struktury cząsteczek oraz roli w odporności (2). Zrewolucjonizowały one pogląd na istotę zjawisk odpornościowych u bezkręgowców i przyczyniły się w dużym stopniu do poznania ewolucji układu odpornościowego oraz sposobów jego działania w obronie przeciwzakaźnej (3). Zainicjowały one badania nad poszukiwaniem analogów i homologów peptydów odpornościowych owadów w świecie roślin i zwierząt wyższych oraz wykazały, że peptydy charakteryzujące się właściwościami obronnymi (host defence peptides – HDPs) występują powszechnie u roślin (4) i kręgowców (5, 6). HDPs stanowią ważną linię naturalnej obrony przeciwzakaźnej i przeciwnowotworowej u ssaków (7).

Wiek XXI bywa określany „wiekiem drobnoustrojów lekoopornych” lub wiekiem „kryzysu antybiotyków” (8). Ten pogląd uzasadniają obserwacje, że coraz częściej nawet błaha zakażenia bakteryjne kończą się zgonem ze względu na niemożliwość ich opanowania, zaś leki niszczące skutecznie drobnoustroje nie mogą być stosowane ze względu na ich wielką toksyczność dla leczonego organizmu. W efekcie poszukiwanie alternatywnych leków przeciwdrobnoustrojowych staje się pilną koniecznością. Jedną z perspektyw

jest możliwość wykorzystania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (antimicrobial peptides – AMPs), których miejscem działania docelowego jest ściana komórki bakterii i w efekcie rzadsza możliwość pojawienia się opornych szczepów (10), szybsze działanie bójcze aniżeli znanych antybiotyków, a także aktywność w stosunku do lekoopornych bakterii. Pojawiła się więc możliwość wykorzystania HDPs jako leków przeciwdrobnoustrojowych, zwłaszcza w przypadku bakterii opornych na wiele leków (11). Analiza odporności owadów stanowiła podstawę do poznania struktury i roli peptydów odpornościowych i zainicjowała badania nad peptydami odpornościowymi ssaków.

Peptydy odpornościowe owadów

Badania nad peptydami obronnymi zapoczątkował w 1970 r. Boman i wsp. (13) z chwilą podjęcia prób wyjaśnienia mechanizmów odporności nabytej (indukowalnej) zaangażowanych w obronę larw muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) przed zakażeniem zjadliwym szczepem *Aerobacter cloacae*. Okazało się, że iniekcja do jamy ciała dawki 10^4 – 10^5 żywych komórek niezjadliwego szczepu *A. cloacae* indukuje po kilku dniach odporność na zakażenie zjadliwym szczepem tej bakterii, przy czym po kilku godzinach liczba zjadliwych komórek w hemolimfie owada spada do <5 (2). Dalsze badania nad indukcją odporności u *Hyalophora cecropia* wykazały, że owady posiadające w rozwoju osobniczym stadium poczwarki (owady holometaboliczne) oprócz odporności naturalnej, związanej z lizozymem, fagocytozą i układem oksydazy polifenolowej, dysponują dodatkowymi substancjami efektorowymi odporności nabytej jamy ciała, jakimi są syntetyzowane *de novo* polipeptydy typu cecropin (13) i attacyn u motyli, dipterycydyn u muchówek (14), apidycyn i aby cyny u imago pszczoły miodnej (15). Pojawienie się polipeptydów odpornościowych w hemolimfie owada poprzedza na kilka godzin synteza specyficznego immunologicznego mRNA (immune-specific mRNA) w wyspecjalizowanym typie komórki ciała tłuszczowego. Odporność indukowana ma głównie na celu zniszczenie bakterii, w mniejszym zakresie grzybów, występujących ubikwitarne w środowisku bytowania danego gatunku owada.

Host defense peptides in animals

Gliński Z., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

This article provides an overview on host defense peptides (HDPs) roles in animals. These are central effector molecules of innate immunity produced by virtually all living animal species. They have been identified also in plants and even in Prokaryotes. In general, HDPs are produced either by *de novo* synthesis or by proteolytic cleavage from antimicrobially inactive pro-proteins. In mammals, several families of peptides exist that display similar mechanisms of action against microorganisms. Many are broad-spectrum microbicides that target Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi and some enveloped viruses. Antimicrobial peptides share cationic charge and hydrophobicity at physiological pH, features that facilitate peptide binding and insertion into microbial membranes. They are not only central in multiple relevant immunological pathways but also offer a novel approach in treating antibiotic resistant bacterial infections and moreover HDPs constitute a novel class of anticancer agents.

Keywords: host defense peptides, innate immunity, animals, antimicrobial therapy.

Indukowalne peptydy odpornościowe owadów występują w 5 klasach w zależności od rzędu owadów, u których występują, struktury, zakresu aktywności przeciwdrobnoustrojowej (16, 17). Cechują się one lityczno-jonoforowym mechanizmem działania, wykorzystując tzw. mechanizm dywanowy uszkodzenia błon (carpet-like mechanism to disrupt membranes) dzięki czemu zwiększa się przepuszczalność błon cytoplazmatycznych organizmów prokariotycznych. Natomiast nie działają uszkadzająco na organizmy eukariotyczne (16).

Peptydy odpornościowe ssaków

Peptydy odpornościowe ssaków tworzą dużą grupę kationowych i hydrofobowych związków syntetyzowanych w rybosomach komórkowych o cząsteczce nieprzekraczającej 100 reszt aminokwasowych (18). Charakter kationowy peptydu jest związany z obecnością dużej ilości reszt arginy i lizyny, a hydrofobowość z obecnością około 50% aminokwasów hydrofobowych w cząsteczce (19). Na podstawie wielkości cząsteczki i trzeciorzędowej struktury wyróżnia się dwie klasy tych peptydów: defensyny i katelicyny. Katelicyny są α -helikalnymi peptydami, podczas gdy cząsteczka defensyny ma charakter β -karkty. Znanych jest ponad 2000 naturalnych i syntetycznych HDPs (20). Efekt ich działania zależy od struktury trzeciorzędowej cząsteczki (21). Większość peptydów

odpornościowych pełni rolę naturalnych antybiotyków i cechuje się aktywnością przeciwbakteryjną, część też aktywnością przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową, przeciw pasożytniczą lub przeciwnowotworową. Wiele z nich jest zaangażowana w regulacji procesów immunologicznych, zapaleniu, posocznicy, gojeniu się ran i odporności przeciw nowotworom (22). Właściwości immunomodulacyjne peptydów odpornościowych obejmują wpływ na odpowiedź pro- i przeciwzapalną, wspomaganie pozakomórkowej i śródkomórkowej destrukcji patogenów, oddziaływanie na różnicowanie komórek układu immunologicznego, aktywację mechanizmów odporności naturalnej i nabytej, modulowanie autofagii, apoptozy i pyroptozy (23).

Nie mniej ważnym polem działania peptydów odpornościowych jest przyspieszenie apoptozy komórek nabłonków oraz opóźnienie apoptozy neutrofilii. LL-37 przyspiesza apoptozę nabłonków układu oddechowego w zakażeniach *Pseudomonas aeruginosa* przez aktywację kaspazy 3 i 9 (24). Hamuje natomiast apoptozę neutrofilii, przez co zostaje wydłużony okres ich biologicznego przeżycia. LL-37 hamuje pyroptozę makrofagów indukowaną pod wpływem LPS/ATP przez aktywację kaspazy 1 oraz bezpośrednie połączenie się z LPS. Efektem tego działania jest zmniejszenie uszkadzającego działania zapalenia (25).

Synteza i ekspresja peptydów odpornościowych ssaków

Peptydy odpornościowe występują w komórkach w formie konstytutywnej jako nieaktywne cząsteczki lub są indukowane w następstwie zakażenia bądź zapalenia (21). Alfa-defensyny występują jako prodefensyny w ziarnistościach fagosomów. W jelicie biodrowym są syntetyzowane głównie w komórkach Panetha leżących u podstawy krypt jelitowych (26). Natomiast β -defensyny są peptydami indukowanymi przede wszystkim w komórkach nabłonkowych. Induktorem syntezy są drobnoustroje, bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) oraz cytokiny zapalne, głównie IL-1 β i TNF- α (21). Patogeny są rozpoznawane na drodze interakcji motywów strukturalnych (pathogen associated molecular patterns – PAMP) z przezbłonowymi receptorami rozpoznania (pattern recognition receptors – PRR), wśród których w indukcji odpowiedzi immunologicznej biorą udział receptory Toll-podobne (TLR). LPS jest klasycznym ligandem dla TLR4, dwuniciowy DNA dla TLR3, CpG jest natomiast ligandem dla TLR9 (27). Do PAMP należą mannany występujące w ścianie drożdży, formylowane peptydy bakteryjne, LPS, lipopeptydy, peptydoglikany,

kwasy tejchojowe, dwuniciowy RNA wirusów, bakteryjne DNA z niemetylowanymi sekwencjami CpG. Aktywacja TLR uruchamia kaskadę, której efektem jest translokacja do jądra komórkowego białka sygnałowego Dif, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych NF- κ B. Są one regulatorami transkrypcji odpowiedzi odpornościowej i białek ostrej fazy. NF- κ B i transaktywatory Dorsal i Dif, indukują ekspresję genów kodujących polipeptydy i białka odpornościowe.

Podobne działanie do PAMP wykazują tzw. cząsteczki alarmowe (danger-associated molecular patterns – DAMP) uwalniane z komórek uszkodzonych mechanicznie lub chemicznie, działaniem promieniowania jonizującego, stresu oksydacyjnego, ekstremalnych temperatur lub komórek ulegających martwicy (28, 29). Szlak sygnałowy NF- κ B odgrywa najważniejszą rolę w produkcji HDPs, mniejsze znaczenie mają natomiast szlaki sygnałowe MAPK i JAK/STAT (30).

Defensyny

Defensyny są drobnocząsteczkowymi, kationowymi, amfipatycznymi peptydami. Cząsteczka jest najczęściej zbudowana z 30–40 reszt aminokwasowych, zawiera w swoim składzie dużą ilość reszt argininy, wiązania dwusiarczkowe w cząsteczce α -defensyny pomiędzy resztami cysteiny (Cys-1-6, Cys 2-4 i Cys 3-5) i pomiędzy Cys (1–5), Cys (2–4), Cys (3–6) w cząsteczce β -defensyn. Defensyny u ssaków są zlokalizowane głównie w fagocytach i stanowią do 50% całkowitej ilości białka w ziarnistościach azurofilnych (31). Występują ponadto w makrofagach tkankowych komórkach nabłonka jelit cienkich, komórkach mięśnia serca, łożach, mleku (32).

Alfa-defensyny HNP-1 i HNP-2 człowieka wyizolowano z neutrofilów, α -defensyny HD-5 i HD-6 z jelit cienkich komórek Panetha i HD-5 z układu moczowo-płciowego kobiet (33). Natomiast α -defensyny nie występują w neutrofilach i w nabłonku jelit bydła (34). β -defensyny (hBD-1 hBD-2, hBD-3) występują w komórkach nabłonków wielu narządów (35) i w skórze, neutrofilach, monocytach, komórkach NK (36, 37).

Trzecią grupę defensyn tworzą tzw. minidefensyny (θ -defensyny), które stwierdza się wyłącznie w granulocytach *Macacus rhesus* i orangutanów. θ -defensyny zbudowane z 18 reszt aminokwasowych, mają kolistą strukturę cząsteczkową, zawierają sześć reszt cysteiny i trzy międzycząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. θ -defensyny wykazują największe działanie antibakteryjne ze wszystkich defensyn (38, 39). Działają na *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* (40).

Rola defensyn w organizmie

Defensyny, będąc kationowymi peptydami, działają na organizmy posiadające błonę komórkową o ładunku ujemnym. Niszczą bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, prątki, komórki grzybów, śródkomórkowe pasożyty i wirusy z otoczką (41). Inicjują odczyn zapalny. Skóra i nabłonek układu oddechowego, przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego oraz ogniska zapalenia stają się najważniejszą areną działania peptydów odpornościowych spełniających rolę pierwszej linii nieswoistej obrony przeciwzakaźnej. Na dużą rolę α -defensyn wskazuje m.in. fakt, że ich poziom wzrasta z 40 ng/ml do > 1 μ g/ml w zakażeniu, osiąga stężenie 170 μ g/ml u pacjentów z posocznicy. Przeciwbakteryjne działanie α -defensyn ujawnia się już w stężeniu 1-100 1 μ g/ml (42).

Ważną rolę odgrywają też w inicjacji odpowiedzi nabytej, działając jako chemotatraktanty na niedojrzałe komórki dendrytyczne (43), mają właściwości opsonin lub wywierają modyfikujący wpływ na aktywność hormonów (44). W zapaleniu mobilizują neutrofile przez indukowanie produkcji IL-8 i pobudzenie migracji immunokompetentnych limfocytów T, wpływają na czynniki zwiększające adhezję i cytotoxicność komórek NK (41). Wpływają też na gojenie się ran, m.in. przez indukowanie syntezy syndekanu, a także oddziałują na przebieg procesu zapalnego, hamując aktywację klasycznej drogi aktywacji dopełniacza. Pobudzają angiogenezę i rozplę nabłonków, posiadają właściwości chemokin, mogą modyfikować szlaki sygnalizacyjne przez hamowanie aktywności kinazy proteinowej C. β -defensyny przyspieszają dojrzewanie plemników. Działają jako modulatory odporności i adiuwanty (45).

Defensyny niszczą komórki nowotworowe (44). W 1993 r. zaobserwowano, że magainina-2 oraz jej analogi wywierają selektywne toksyczne działanie *in vitro* na komórki raka w takim samym zakresie jak deksorubicyna (46). Cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworów oraz hamowanie rozrostu nowotworowego cechuje liczne peptydy odpornościowe (47, 48).

Przeciwdrobnoustrojowe działanie defensyn

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w odróżnieniu od antybiotyków cechują się szerokim spektrum aktywności, działają na bakterie, grzyby, wirusy i pasożyty, działanie jest szybkie, wykazują synergizm z wieloma konwencjonalnymi antybiotykami, neutralizują endotoksyny bakteryjne, są aktywne w niskich stężeniach, bardzo rzadko indukują pojawienie się opornych szczepów

oraz działają na bakterie odporne na wiele leków. Szczególnie ważne jest ich działanie na superbakterie, zwłaszcza enterokoki odporne na wankomycynę (VRE), odporne na wiele leków szczepy *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Acinetobacter* oraz szczepy *Pneumococcus* odporne na fluorochinolony (49).

Defensyna konia eNAP-1 w stężeniu 100 µg/ml w ciągu 2 godz. powoduje ponad 99,8% spadek jednostek tworzących kolonię *S. zooepidemicus*, 87% *E. coli* i 90% *P. aeruginosa*. β-defensyny bydła działają bakterio-bójczo na *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, niszczą *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. Ich ekspresja ma miejsce w przewodzie pokarmowym, układzie oddechowym, gruczoł mlekowym i nabłonku rogówki oka (50). eCATH-2 konia działa na *E. coli*, *S. aureus*, eCATH-3 na *C. neoformans* i *Rhodotorula rubra*. Jednak ich aktywność silnie hamuje fizjologiczne stężenie soli (18). β-defensyny psa są aktywne w stosunku do *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria* spp., *C. albicans* i *Ureaplasma*. K9CATH oprócz tego działania ma właściwości immunomodulatora.

Przeciwdrobnoustrojowe działanie peptydów odpornościowych jest związane z takimi właściwościami, jak kationowym charakterem cząsteczki, tworzeniem konformacji amfifilicznych i amfipatycznych podczas kontaktu z błonami komórki drobnoustrojów (21, 51). Po przedostaniu się przez matrix peptydoglikanową ściany komórki uszkodzają błonę komórkową. U bakterii Gram-ujemnych ulega destrukcji zarówno ściana, jak i błona komórkowa.

Miejszem docelowego działania peptydów odpornościowych jest błona komórkowa, która ma ładunek ujemny i zawiera fosfolipidy, a nie zawiera cholesterolu, który występuje w błonie komórkowej organizmów wyższych (19). Brak uszkodzającego działania peptydów w stężeniach fizjologicznych na organizmy wyższe jest spowodowany obecnością cholesterolu i niskim ładunkiem elektrycznym błony komórkowej. Cząsteczka peptydu o wysokim ładunku elektrycznym ma wyższe powinowactwo do bakterii aniżeli do błon komórek ssaków. Ładunek błon eukariotów jest niski (-15 mV) w porównaniu do ładunku błony prokariotów (-150 mV; 41).

Postuluje się dwa mechanizmy przeciwdrobnoustrojowego działania defensyn. Jeden polega na tworzeniu otworów (pore mechanism) w błonie komórkowej, drugi mechanizm określany jako „dywanowy” (carpet mechanism) jest powszechnie obowiązujący. Według tego mechanizmu działania cząsteczki peptydu gromadzą się na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej i w miejscach, w których osiągają stężenie krytyczne, na skutek różnic w wielkości ładunku elektrycznego

i napięcia powierzchniowego, niszczą integralność fosfolipidów błony, czego następstwem jest fragmentacja dużych odcinków błon (52). Utrata integralności błony powoduje wypływ z komórki zawartości cytoplazmy, jonów, aktywnych biologicznie cząsteczek i wody (34, 39).

Katelicyny

Katelicyny są heterolegenną grupą kationowych drobnocząsteczkowych peptydów odpornościowych występujących w ziarnistościach wydzielniczych neutrofilii i makrofagów oraz w komórkach nabłonków w formie nieaktywnych prekursorów (7, 53) u człowieka, bydła, koni, świń, owiec, kóz, drobiu, królików i niektórych gatunków ryb. Po raz pierwszy zostały wykryte w komórkach mieloidalnych szpiku kostnego bydła (54) i były określane terminem „mieloidalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe”.

Cząsteczka katelicyny składa się z 12 do 80 reszt aminokwasowych, przy czym większość to peptydy linearne zbudowane z 23–37 reszt aminokwasowych tworzące amfipatyczną α-heliksę. Budowa cząsteczki wykazuje homologię z inhibitorami proteinazy cysteiny. Niektóre katelicyny są krótkołańcuchowymi peptydami zawierającymi od 12 do 18 reszt aminokwasowych o strukturze β-herpiny stabilizowanej przez jeden lub dwa mostki dwusiarczkowe. Natomiast katelicyny o cząsteczce zbudowanej z 39–80 reszt aminokwasowych charakteryzują się powtarzalnym motywem prolinowym. W cząsteczce katelicyny występuje wysoce konserwatywny region katelinowy (domena katelinowa) w części N-terminalnej w regionie 5' oraz zmienna domena katelicynowa w części C-terminalnej cząsteczki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (55). W organizmie zachodzi albo bezpośrednia synteza katelicyn w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych oraz pod wpływem niektórych hormonów, albo pod działaniem elastazy neutrofilii nieaktywny propeptyd nagromadzony w ziarnistościach ulega rozkładowi na aktywne składowe i jest uwalniany z komórki (56).

Mechanizm działania katelicyn

Katelicyny są aktywne w fagocytozie oraz w odporności miejscowej błon śluzowych, a także uczestniczą w niektórych zjawiskach patologicznych. Współdziałają przy tym z defensynami w odporności naturalnej (57). Mechanizm działania zależy od trzeciorzędowej struktury cząsteczki i polega na szybkiej destrukcji błon lipoproteinowych drobnoustrojów w fagosomach makrofagów (58). Dezintegracja ściany komórkowej drobnoustrojów jest

związana z powstaniem transmembranowych otworów. Katelicyny nie uszkodzają natomiast zdrowych komórek organizmów eukariotycznych (59). W przypadku bakterii Gram-ujemnych po przekroczeniu bariery peptydoglikanowej błony komórkowej katelicyny przenikają przez ścianę komórkową do cytoplazmy komórki bakteryjnej. Istnieje kilka hipotez dotyczących mechanizmu tego procesu. Według jednej cząsteczki peptydu rozsadzają zewnętrzną hydrofilową warstwę błony cytoplazmatycznej, co prowadzi do pojawienia się w niej przerw. Inny mechanizm, tzw. połączonych kanałów, polega na tworzeniu wiązek peptydów ze strukturami błony cytoplazmatycznej, które penetrując do wnętrza komórki, powodują powstanie otworów w błonie cytoplazmatycznej.

Katelicyny mogą aktywizować czynniki wewnątrzkomórkowe indukujące autolizę fosfolipazy A2 (60). Katelicyna prosiat PR-39, indolicyna i syntetyczny peptyd PR-26 hamują syntezę białek w komórce i rozkład białek niezbędnych do replikacji DNA patogenów. Aktywność przeciwrzybicza katelicyn bydła jest efektem uszkodzenia ściany komórkowej związanej z ich bezpośrednim działaniem na warstwę lipidową komórki. Indolicyna może wpływać na DNA przez hamowanie aktywności topoiizomerazy 1 (62).

Indolicyny należą do katelicyn o cząsteczce zbudowanej z 13 reszt aminokwasowych (H-Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂), zawierającej 5 reszt tryptofanu. Występują w ziarnistościach neutrofilii bydła i działają bójczo na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne oraz na grzyby. W stężeniu 10 µg/ml działają bakteriobójczo na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Cechują się też właściwościami przeciwrzybiczymi i antyoksydacyjnymi (63). Syntetyczna indolicyna (CP-11C) działa silniej przeciwbakteryjnie i jest mniej toksyczna. Mechanizm ich działania w przypadku *E. coli* jest złożony i polega na tworzeniu kanałów, przez co zwiększa się przepuszczalność błony komórki bakteryjnej przy braku działania litycznego, powstawaniu form nitkowatych, hamowaniu syntezy DNA w stężeniach niewpływającym lub tylko wpływającym w niewielkim zakresie na syntezę RNA i białek (64).

Baktencyny to kalicydyny zawierają w cząsteczce 43 (Bac5) lub 60 (Bac7) reszt aminokwasowych przy dużej ilości reszt proliny (65). Działają silniej bójczo na bakterie Gram-ujemne, aniżeli na bakterie Gram-dodatnie (66). Bac5 i Bac7 działają bakteriobójczo na *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* i bakteriiostaticznie na *Enterobacter cloacae* (65), *Leptospira interrogans* i *L. biflexa* (67), inaktywują niektóre wirusy.

Natomiast Bac2S jest aktywna w stosunku do *P. aeruginosa*. Syntetyczne baktencyny (BMAP-27 i BMAP-28) przy szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, nawet na MRSA i grzyby cechują się małą cytotoxycznością dla organizmu.

Protegryny o strukturze β -hirpinowej, z 16–18 resztami aminokwasowymi w cząsteczce, dwoma mostkami S-S pomiędzy resztami cysteiny występują w szpiku i neutrofilach świni (68). Działają one silnie na bakterie Gram-ujemne, grzyby i niektóre wirusy w stężeniu 1–5 $\mu\text{g/ml}$ (69), a protegryna PG-1 niszczy leptospiry, silnie działa na *Mycobacterium tuberculosis* i bakterie wywołujące zakażenia przyranne. Zakażenie zwiększa syntezę protegryny PR-39 w komórkach szpiku. Jest ona zaangażowana w gojeniu się ran i pełni rolę inhibitora apoptozy, a jej działanie przeciwbakteryjne jest podobne do tetracykliny. Jest uznana za jeden z nowych biomarkerów stanu fizjologicznego układu oddechowego u prosiąt (70). Profeniny (Prof-1, Prof-2) występujące w leukocytach i surfaktancie oskrzelików prosiąt cechuje szerokie spektrum działania w małych dawkach na bakterie Gram-ujemne, zwłaszcza *E. coli*, węższe na bakterie Gram-dodatnie (*L. monocytogenes*) oraz na *Candida albicans* i niczenie (71).

LL-37 o cząsteczce zawierającej 37 reszt aminokwasowych występuje w powierzchniowych warstwach skóry, komórkach nabłonka jąder, śluzówce przewodu pokarmowego i nabłonkach układu oddechowego, monocytach, neutrofilach, limfocytach T i B, komórkach NK. Działa na dermatofity, MIC w przypadku *Trichophyton mentagrophytes* wynosi 12,5 μM , a w przypadku *T. rubrum* 25 μM (72). Działa też na bakterie, odgrywa rolę regulatora zapalenia, neutralizuje bakteryjny LPS, współdziała w gojeniu się ran i odnowie naskórka. U pacjentów z grzybicą skóry występuje zwiększony poziom katelicyny LL-37 (73). Zwiększony poziom LL-37 w surowicy zapobiega też wtórnym zakażeniom u pacjentów z przeszczepem nerki.

Podsumowanie

Obecnie, chociaż w ograniczonym zakresie, peptydy odpornościowe są wykorzystywane w leczeniu zakażeń spowodowanych przez bakterie odporne na wiele leków. Dla większości znanych peptydów odpornościowych w przypadku lekoopornych bakterii wartości MIC są znacznie niższe aniżeli konwencjonalnych antybiotyków. Natomiast ze względu na łatwość modyfikacji struktury cząsteczki można dla zmodyfikowanych peptydów uzyskać znacznie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz lepszą stabilność. Działanie przeciwnowotworowe niektórych peptydów

odpornościowych stwarza możliwość ich stosowania w nieinwazyjnej terapii choroby nowotworowej. Szczególnie cenne są właściwości peptydów odpornościowych do mobilizacji układu immunologicznego, co stanowi perspektywę dla ich wykorzystania jako biologicznych immunomodulatorów, pozbawionych działań niepożądanych.

Piśmiennictwo

1. Strominger J.L.: Animal antimicrobial peptides: ancient players in innate immunity. *J. Immunol.* 2009, **182**, 6633–6634.
2. Boman H.G., Nilsson I., Rasmuson B.: Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* 1976, **237**, 232–235.
3. Bulet P., Stöcklin R.: Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*. 2005, **12**, 3–11.
4. Castro M.S., Fontes W.: Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2005, **12**, 11–16.
5. Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R.B.: Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestines. *J. Peptide Res.* 1997, **49**, 59–66.
6. Linde A., Ross C.R., Davies E.G., Dib L., Blecha F., Melgarejo T.: Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.* 2008, **22**, 247–265.
7. Sörensen O.E., Borregaard N., Cole A.M.: Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib. Microbiol.* 2008, **15**, 61–77.
8. Livermore D. M.: The need for new antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, **10**, 1–9.
9. Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W.: Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Front. Neurosci.* 2017, **11**, 73–98.
10. Deslouches B., Steckbeck J.D., Craig J.K., Doi Y., Mietzner T.A., Montelaro R.C.: Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, **57**, 2511–2521.
11. Popo N., Shai Y.: Host defense peptides as a new weapons in cancer treatment. *Cell Moll. Life Sci.* 2005, **62**, 784–790.
12. Feluccio M.R., Silva O.N., Gonçalves S., Santos N.C., Franco O.L.: Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Front Chem.* 2017, Feb 21:55. doi: 10.3389/fchem.2017.00005. eCollection 2017.
13. Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y., Lindholm D.A.: Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 1991, **201**, 23–31.
14. Gliński Z., Kostro K.: Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2001, **26**, 43–50.
15. Gliński Z., Jarosz J.: Apidaecins and abaecin, the effector substances of inducible immune responses of the honeybee. *Pol. J. Immunol./Immunologia Polska*. 1995, **20**, 137–148.
16. Rosengren K.J., McManus A.M., Craik D.J.: The structural and functional diversity of naturally occurring antimicrobial peptides. *Cur. Med. Chem.-Anti-Infect. Agents*. 2002, **1**, 319–341.
17. Ezzati-Tabrizi R., Farrokh N., Talaei-Hassanlou R., Alavi S.M., Hosseinaveh V.: Insect inducible antimicrobial peptides and their applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013, **14**, 698–710.
18. Ganz T., Lehrer R.L.: Antibiotic peptides from higher eukaryotes: Biology and applications. *Mol. Today* 1999, **5**, 292–297.
19. Zasloff M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002, **415**, 389–395.
20. Wang G., Li X., Wang Z.: APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016, **44**, D1087–D1093. 10.1093/nar/gkv1278.
21. Sima P., Trebichavsky I., Sigler K.: Mammalian antibiotic peptides. *Folia Microbiol. (Praha)* 2003, **48**, 123–137.
22. Gordon Y.J., Romanowski E.G., McDermott A.M.: A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 2005, **30**, 505–515.
23. Mansour S.C., Pena O.M., Hancock R.E.: Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.* 2014, **39**, 443–450.
24. Barlow P.G., Beaumont P.E., Cosseau C., Mackeller A., Wilkinson T.S., Hancock R.E.W., Haslett C., Govan J.R.W.,

- Simpson A.J., Davidson D.J.: The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airways epithelium. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010, **43**, 692–702.
25. Hu Z., Murakami T., Suzuki K., Tamura H., Kawahara-Arai K., Iba T., Nagoaka I.: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS ONE* 2014, **9**, p. e85765.
26. Lala S., Ogura Y., Osborne C., Hor S.Y., Bromfield A., Davies S., Ogunbiyi O., Nuñez G., Keshav S.: Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003, **125**, 47–57.
27. Dalpke A.H., Lehner M.D., Hartung T.: Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* 2005, **116**, 203–212.
28. Seong S.Y., Matzinger P.: Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, **4**, 469–478.
29. Matzinger P.: Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control? *Nat. Immunol.* 2007, **8**, 11–13.
30. Krisanaprakornkit S., Kimball J.R., Dale B.A.: Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: The involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J. Immunol.* 2002, **168**, 316–324.
31. Ganz T.: Defensins and other antimicrobial peptides: A historical perspective and an update. *Comb. Chem. High. Throu. Screen* 2005, **8**, 209–217.
32. Brogden K.A., Ackermann M., McCray P.B. jr.: Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003, **22**, 465–478.
33. Porter E.M., Liu L., Oren A., Anton P.A., Ganz T.: Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect. Immun.* 1997, **65**, 2389–2395.
34. Hancock R.E., Sahl H.G.: Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 2006, **24**, 1551–1557.
35. Schutte B.C., Mitros J.P., Bartlett J.A., Walters J.D., Jia H.P., Welsh M.J., Casavant T.L., McCray jr P.B.: Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, **99**, 2129–2133.
36. Garcia J.R., Krause A., Schulz S., Rodriguez-Jimenez E.J., Klüber E., Adermann K., Forssmann U., Frimpong-Boateng A., Bals R., Forssmann W.G.: Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 2001, **15**, 1819–1821.
37. Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J.F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y.: Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 2004, **104**, 1778–1783.
38. Selsted M.E.: Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated Ralpha-defensins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2004, **5**, 365–372.
39. Selsted M.E., Ouellette A.J.: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 2005, **6**, 551–557.
40. Tran D., Tran P., Roberst K., Ösapay G., Schaal J., Ouellette A.: Selected microbicidal properties and cytotoxic selectivity of Rhesus macaque theta defensin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**, 3944–3953.
41. Scott M.G., Hancock R.E.: Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 2000, **20**, 407–431.
42. Ganz T., Lehrer R.L.: Defensins. *Curr. Opin Immunol.* 1994, **6**, 584–589.
43. Yang D., Biragyn A., Hoover D.M.: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Ann. Rev. Immunol.* 2004, **22**, 181–215.
44. Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.L.: Defensins. *Eur. J. Haematol.* 1990, **44**, 1–8.
45. Mookherjee N., Hancock R. E.: Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, **64**, 922–933.
46. Huang W., Seo J., Willingham S.B., Gonzalvo M.L., Weissman L.L., Barron A.E.: Cationic, amphipathic peptides with potent anticancer activity. *PLoS ONE* 9 (2): e90397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090397>.
47. Hoskin D.W., Ramamoorthy A.: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 2008, **1778**, 357–337.
48. Papo N., Shai Y.: Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol. Life Sci.* 2005, **62**, 784–790.

49. Gorman S.P., Glimore B.F.: Clinical relevance of the escape pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2013, **11**, 297–308.
50. Schonwetter B.S., Stolzenberg E.D., Zasloff M.A.: Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995, **267**, 1645–1648.
51. Almaaytah A., Ajjing Y., Abualhaijaa A., Tarazi S., Alshari N., Al-Balas Q.: Peptide consensus sequence determination for the enhancement of the antimicrobial activity and selectivity of antimicrobial peptides. *Infect. Drug Resist.* 2016, **10**, 1–17.
52. Gazit E., Miller I.R., Biggin P.C., Sansom M.S.P., Shai Y.: Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J. Mol. Biol.* 1996, **258**, 860–870.
53. Zanetti M.: The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005, **7**, 179–196.
54. Bals R., Wilson J.M.: Cathelicidins: a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2003, **60**, 711–720.
55. Tomasinsig L., Zanetti M.: The cathelicidins – Structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005, **6**, 23–34.
56. Treffers C., Chen L., Anderson R.C., Yu P.L.: Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005, **26**, 165–169.
57. Nagaoka I., Hirota S., Yomogida S.: Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm. Res.* 2000, **49**, 73–79.
58. Kościuczuk E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwiak A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E.: Cathelicidins: family of antimicrobial peptides: A review. *Mol. Biol. Rep.* 2012, **39**, 10957–10970.
59. Ramanathan B., Davis E.G., Ross C.R., Blecha F.: Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002, **4**, 361–372.
60. Seil M., Nagant C., Dehaye J.P., Vandendrienen M., Lensink M.F.: Spotlight on human LL-37, an immunomodulatory peptide with promising cell-penetrating properties. *Pharmaceuticals.* 2010, **3**, 3435–3460.
61. D.G., Kim H.K., Kim S.A., Park Y., Park S.C., Jang S.H., Hahn K.S.: Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2003, **305**, 305–310.
62. Marchand C., Krajewski K., Lee H.F., Antony S., Johnson A.A., Amin R., Röllner P., Kvaratskhelia M., Pommier Y.: Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Res.* 2006, **34**, 5157–5165.
63. Lee D.G., Kim H.K., Kim S.A.: Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, **305**, 305–310.
64. Chilukuri Subbalakshmi C., Sitaram N.: Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, **160**, 91–96.
65. Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D.: Purification, composition, and activity of two bactericidins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 1989, **5**, 3142–3146.
66. Tomasinsig L., Conti G., Skerlavaj B., Piccinini R., Mazzilli M., D'Este F., Tossi A., Zanetti M.: Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect. Immun.* 2010, **78**, 1781–1788.
67. Scocchi M., Romeo D., Cinco M.: Antimicrobial activity of two bactericidins against spirochetes. *Infect. Immun.* 1993, **61**, 3081–3083.
68. Jang H., Ma B., Nussinov R.: Conformational study of the protegrin-1 (PG-1) dimer interaction with lipid bilayers and its effect. *BMC Struct Biol.* 2007, **2**, 7–21.
69. Ramanathan B., Davis E.G., Ross C.R., Blecha F.: Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002, **4**, 361–372.
70. Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Blecha F.: Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an Actinobacillus pleuropneumonia infection. *Vet Res* 2006, **37**, 75–87.
71. Wangl Y., Walter G., Herting E., Agerberth B., Johansson 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. J.* 2004, **48**, 2097–2100.
72. Dürr U.H.N., Sudheendra U.S., Ramamoorthi A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochem. Biophys. Acta-Biomembranes* 2006, **1758**, 1408–1425.
73. López-García B., Lee P.H.A., Gallo R.L.: Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, **57**, 877–882.