

WOJCIECH KAMYSZ, PIOTR NADOLSKI

PRZECIWBAKTERYJNA AKTYWNOŚĆ PEPTYDÓW ZE SKÓRY PŁAZÓW

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PEPTIDES FROM AMPHIBIANS SKIN

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej z Pracownią Analizy Instrumentalnej AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Jerzy Łukasiak

Przedmiotem pracy było zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyków peptydowych pierwotnie wyizolowanych ze skóry żab. Związki zsyntezowano metodą na stałym nośniku z wykorzystaniem metodologii Fmoc. Oczyszczonym peptydom oznaczono MIC na szczepach referencyjnych zalecanych do badania środków konserwujących: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Uzyskane wyniki porównano z wartościami MIC uzyskanymi dla klasycznych konserwantów. Syntetyczne polipeptydy hamowały wzrost badanych bakterii w stężeniach wyższych niż konwencjonalne środki stosowane w konserwacji leków i kosmetyków. Zaletą związków peptydowych jest jednak ich naturalne pochodzenie oraz niska toksyczność.

Jednym z najpoważniejszych problemów, z jakim musi się zmierzyć współczesna medycyna, jest zwalczanie drobnoustrojów opornych na konwencjonalne antybiotyki oraz opanowanie rosnącej liczby nowych zakażeń.

Duże nadzieje aplikacyjne wiąże się z odkrytymi przed dwudziesty laty endogennymi antybiotykami peptydowymi [1]. Cechą wspólną tych związków i antybiotyków peptydowych dotychczas stosowanych, oprócz nazwy, są aminokwasy jako element budowy chemicznej. Różnią się jednak znacznie ze względu na źródło pochodzenia, występowanie fragmentów niebiałkowych oraz właściwości biologiczne. Niektóre peptydy charakteryzują się szerokim spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, bakterii Gram-ujemnych jak i grzybów. Większość z nich działa na zasadzie permeabilizacji błony drobnoustrojów. Wiążąc się ze składnikami błon drobnoustrojów destabilizują strukturę dwuwarstwy lipidowej, mogą ponadto tworzyć micelle lub kanały w obrębie błony [2]. Znane są również peptydy powodujące uwalnianie ATP, zatrzymanie replikacji DNA czy zahamowanie ekspresji białek strukturalnych. Do niewątpliwych zalet niektórych peptydów przeciwdrobnoustrojowych należy zdolność do wiązania się z lipopolisacharydem (LPS), przez co zapobiegają skutkom wstrząsu septycznego [3, 4]. „Stare” antybiotyki peptydowe są stosowane w medycynie od ponad pół wieku. Jednak

ze względu na wysoką nefro- i hepatotoksyczność oraz właściwości hemolizujące pełnią one ograniczoną rolę. Ponadto brak wchłaniania z przewodu pokarmowego zdecydował głównie o miejscowym stosowaniu tych środków. Endogenne antybiotyki peptydowe uważa się za dużo bezpieczniejsze. W przeciwieństwie do swych poprzedników izolowanych z kultur promieniowców *Streptomyces* „nowe” antybiotyki peptydowe są składnikami wszystkich organizmów eukariotycznych, gdzie stanowią ważny element ich układu odpornościowego [2]. Są składnikami śliny, występują na wszystkich powierzchniach eksponowanych do środowiska zewnętrznego, mogą być także wydzielane przez neutrofile. Stanowią doskonałą matrycę do poszukiwania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych zarówno w zwalczaniu zakażeń, jak i konserwacji leków.

Niniejsza praca prezentuje badania dotyczące oceny właściwości przeciwbakteryjnej czterech polipeptydów wchodzących w skład wydzieliny skóry żab. Metodą syntezy chemicznej otrzymano następujące antybiotyki peptydowe: aureinę 1.2 (GLFDIHKKIAESF-NH₂), citropinę 1.1 (GLFDVIKKVASVIGGL-NH₂), fyloseptynę 1 (FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH₂) oraz uperynę 3.6 (GVIDAAKKVVNLKNLF-NH₂) [6–9]. Peptydy te zostały wstępnie przebadane przez innych autorów, a prezentowane badania poszerzają wiedzę na ich temat i porównują aktywność przeciwdrobnoustrojową peptydów z aktywnością konwencjonalnych związków stosowanych w konserwacji leków. W badaniach zastosowano środki konserwujące o działaniu przeciwdrobnoustrojowym: chlorek benzalkoniowy i bronopol.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne

Do badań mikrobiologicznych wykorzystano następujące szczepy referencyjne: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739. Drobnoustroje pochodziły z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Polska Akademia Nauk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Wrocław).

Związki przeciwdrobnoustrojowe

Peptydy zostały otrzymane metodą na stałym nośniku Polystyrene AM-RAM (Rapp Polymere, Niemcy) z wykorzystaniem osłony 9-fluorenylometoksykarbonylowej (Fmoc) [10]. Wszystkie pozostałe odczynniki użyte do syntez pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Poznań, Polska).

Stosowano następujący schemat syntezy: 1) deprotekcja 20% roztworem piperydyny w dimetyloformamidzie (DMF); 2) acylowanie (sprzęganie) chronionym aminokwasem w DMF z dodatkiem 1% Tritonu z zastosowaniem N,N'-diizopropylkarbodiimidu (DIC) jako środka sprzęgającego oraz 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt) przez 2 godziny. Stopień każdego acylowania badano testem chloranilowym [11]. Jeśli test był pozytywny, reakcję powtarzano z zastosowaniem tetrafluoroboranu O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (TBTU) i HOBt w obecności diizopropylloaminy (DIPEA) przez 2 godziny.

Chronione peptydylo-żywice poddawano działaniu mieszaniny: kwas trifluoroctowy (95%), woda (2,5%) i triizopropylsilan (2,5%) przez 2 godziny. Stały nośnik odsączano a przesącz zateżano pod zmniejszonym ciśnieniem. Odszczepione peptydy wytrącano schłodzonym eterem dietylowym oraz liofilizowano.

Peptydy oczyszczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie K501 firmy Knauer z kolumną Kromasil C8 (10 x 250 mm, średnica ziaren sorbentu 5 μm , wielkość porów 100 \AA). Otrzymane frakcje o czystości wyższej niż 95–97% analizowano metodą HPLC (kolumna Kromasil C8, 4,6 x 250 mm) przy przepływie 1,2 ml/min oraz długości fali $\lambda = 226 \text{ nm}$. Peptydy analizowano też metodą spektrometrii mas z desorpcją laserową na matrycy i analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF).

Chlorek benzalkoniowy oraz bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska).

Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych

Testy mikrobiologiczne miały na celu określenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC) peptydów i klasycznych środków konserwujących dla szczepów wzorcowych. Testy wykonywano metodą mikrorozcieńczeń w płynnym podłożu Mueller-Hinton II z kationami (Becton Dickinson) na 96-dółkowych płytkach polipropylenowych (Nunc GmbH & Co. KG, Niemcy). Określenie MIC zostało przeprowadzone zgodnie z bieżącymi zaleceniami NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [12].

Peptydy, chlorek benzalkoniowy i bronopol rozpuszczano w jałowej dejonizowanej wodzie oraz sporządzano rozcienienia w postępie geometrycznym w podłożu bulionowym MH II. Do przygotowanych rozcienień badanych preparatów dodawano 50 μl 18 godzinnych hodowli bulionowych wybranych szczepów testowych bakterii o gęstości 10^5 CFU/ml . Próby inkubowano przez 18 godzin w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ w obecności prób kontrolnych (kontrola żywności podłoża, jałowości podłoża i jałowości badanego preparatu) w objętości 100 μl . Po inkubacji stwierdzano wizualnie wzrost bakterii i określono MIC.

WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku testów mikrobiologicznych przebadano sześć związków: aureinę 1.2, citropinę 1.1, fyloseptynę 1, uperynę 3.6, chlorek benzalkoniowy oraz bronopol. Spośród badanych peptydów najwyższą aktywność wykazały uperyna 3.6 oraz citropina 1.1. Hamowały one wzrost bakterii *E. coli* w stężeniu 128 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy chlorek benzalkoniowy działał w stężeniu 16 $\mu\text{g/ml}$, a bronopol w stężeniu 4 $\mu\text{g/ml}$. Wobec bakterii *S. aureus* peptydy działały w stężeniach odpowiednio 16 $\mu\text{g/ml}$ dla uperyny 3.6 i 8 $\mu\text{g/ml}$ dla citropiny 1.1, a chlorek benzalkoniowy i bronopol hamowały wzrost bakterii w stężeniu odpowiednio 2 $\mu\text{g/ml}$ i 4 $\mu\text{g/ml}$. Peptydy hamowały wzrost bakterii *P. aruginosa* w wyższych stężeniach (256 $\mu\text{g/ml}$) niż konwencjonalne substancje konserwujące (32 $\mu\text{g/ml}$ chlorek benzalkoniowy i 8 $\mu\text{g/ml}$ bronopol). Mniej skuteczna okazała się też aureina 1.2, która hamowała wzrost bakterii w dużo wyższych stężeniach niż konwencjonalne substancje konserwujące. Spośród badanych peptydów najniższą aktywność wykazała fyloseptyna, która działała dopiero w stężeniu powyżej 256–512 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy MIC dla chlorku benzalkoniowego i bronopolu wahał się od 4 do 32 $\mu\text{g/ml}$.

Podsumowując otrzymane wyniki, badane antybiotyki peptydowe wykazywały działanie przeciwbakteryjne wobec badanych szczepów referencyjnych, jednakże stężenia wymagane do zahamowania wzrostu bakterii były kilka do kilkadziesiąt razy wyższe od stężeń konwencjonalnych substancji konserwujących. Uzyskane dane mają charakter wstępny i nie oznaczają,

że badania wspomnianych peptydów przeciwbakteryjnych jako środków konserwujących należy zarzucić. Warto nadmienić, iż klasyczne związki często nie są skuteczne wobec wybranych szczepów patogennych bakterii [13, 14], a ponadto wywołują niepożądane efekty uboczne, zarówno o charakterze ogólnym, jak i podrażnienia skóry czy reakcje uczuleniowe [15, 16]. Badania prowadzone w Polsce dowodzą, iż w ciągu 10 lat nadwrażliwość na jeden z konserwantów – Euxyl K 400 wzrosła z 0,7% do 3,5% populacji [15]. Badania prowadzone na szerszą skalę w Szwajcarii ujawniły, iż u 5,5% pacjentów skarżących się na podrażnienia skóry reakcję uczuleniową wywołuje chlorek benzalkoniowy [16].

Naturalne związki przeciwbakteryjne zbudowane z aminokwasów roją nadzieję na bezpieczne środki konserwujące. Opierając się na ich oryginalnej strukturze można konstruować analogi o zwiększonej aktywności i ulepszonych parametrach farmakokinetycznych. W stosunku do niektórych bakterii pierwotne właściwości przeciwbakteryjne peptydów są zadowalające, tak jak w przypadku uperyny i citropiny wobec gronkowca złocistego.

Tab. I

Aktywność przeciwbakteryjna peptydów oraz konwencjonalnych środków konserwujących względem szczepów referencyjnych bakterii

Antibacterial activity of peptides and conventional preservatives against reference strains of bacteria

Związek Compound	Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) [µg/ml] Minimal inhibitory concentration (MIC)		
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
Aureina 1.2 Aurein 1.2	256	32	256
Citropina 1.1 Citropin 1.1	128	8	256
Fyloseptyna 1 Phylloseptin 1	>512	256	>512
Uperyna 3.6 Uperin 3.6	128	16	256
Chlorek benzalkoniowy Benzalkonium chloride	16	2	32
Bronopol	4	4	8

WNIOSKI

1. Badane antybiotyki peptydowe ze skóry płazów wykazywały działanie przeciwbakteryjne na szczepy stosowane w teście konserwacji.
2. W porównaniu z obecnie stosowanymi konwencjonalnymi substancjami konserwującymi (bronopol, chlorek benzalkoniowy) badane antybiotyki peptydowe hamowały wzrost bakterii w wyższych stężeniach.
3. Na podstawie przeprowadzonych badań aktywności przeciwbakteryjnej związków peptydowych, można stwierdzić, iż stanowią one dobrą matrycę i punkt wyjścia do konstrukcji efektywniejszych i bezpieczniejszych związków przeciwbakteryjnych o szerokim zastosowaniu – w tym także do konserwacji leków i kosmetyków.

Podziękowania

Jeden z autorów pracy (Wojciech Kamysz) jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

PIŚMIENNICTWO

1. Boman H. G., Steiner H.: Humoral immunity in *Cecropia* pupae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1981, 94–95, 75. – 2. Kamysz W., Okrój M., Łukasiak J.: Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 2003, 50, 2, 461. – 3. Hancock R. E., Chapple D. S.: Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 6, 1317. – 4. Gough M., Hancock R. E., Kelly N. M.: Antidotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* 1996, 64, 12, 4922. – 5. Koczulla A. R., Bals R.: Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 2003, 63, 4, 389. – 6. Rozek T., Wegener K. L., Bowie J. H., Olver I. N., Carver J. A., Wallace J. C., Tyler M. J.: The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* the solution structure of aurein 1.2. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 17, 5330. – 7. Wegener K. L., Wabnitz P. A., Carver J. A., Bowie J. H., Chia B. C., Wallace J. C., Tyler M. J.: Host defence peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree-frog *Litoria Citropa*. Solution structure of the antibacterial peptide citropin 1.1. *Eur. J. Biochem.* 1999, 265, 2, 627. – 8. Leite J. R., Silva L. P., Rodrigues M. I., Prates M. V., Brand G. D., Lacava B. M., Azevedo R. B., Bocca A. L., Albuquerque S., Bloch C. Jr.: Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 2005, 26, 4, 565. – 9. Chia B. C., Carver J. A., Mulhern T. D., Bowie J. H.: The solution structure of uperin 3.6, an antibiotic peptide from the granular dorsal glands of the Australian toadlet, *Uperoleia mjobergii*. *J. Pept. Res.* 1999, 54, 2, 137. – 10. Fields G. B., Noble R. L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35, 3, 161.
11. Christensen T.: Qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand. Ser. B. (Org. Chem. Biochem.)* 1979, 33, 763. – 12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard M7-A4. Villanova PA, 1997. – 13. Aarestrup F. M., Hasman H.: Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet. Microbiol.* 2004, 100, 1/2, 83. – 14. Braoudaki M., Hilton A. C.: Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005, 25, 1, 31. – 15. Kieć-Świerczyńska M., Kręcisz B., Świerczyńska-Machura D.: Uczulenie na kosmetyki. II. Środki konserwujące. *Med. Pr.* 2004, 55, 3, 289. – 16. Perrenoud D., Bircher A., Hunziker T., Suter H., Bruckner-Tuderman L., Stager J., Thurlimann W., Schmid P., Suard A., Hunziker N.: Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. Swiss Contact Dermatitis Research Group. *Contact Dermatitis* 1994, 30, 5, 276.

W. Kamysz, P. Nadolski

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PEPTIDES FROM AMPHIBIANS SKIN

Summary

The above work was concerned with antimicrobial activity of peptides primarily isolated from the skin of frogs. The peptides were synthesized manually by a solid-phase method using the Fmoc methodology. The purified peptides were subjected to microbiological tests (MIC) on reference strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The obtained results were compared with the values of MIC obtained for typical preservatives. The synthetic polypeptides inhibited growth of the examined bacteria but this effect was achieved at concentrations higher than for the substances used in preservation of drugs and cosmetics. Nevertheless, natural origin of antimicrobial peptides and their low toxicity constitute a considerable advantage.

Adres: dr Wojciech Kamysz
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej AMG
al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
e-mail: kamysz@amg.gda.pl