

## GELECEĞİN ANTİBİYOTİKLERİ: ANTİMİKROBİK ETKİLİ KATYONİK PEPTİTLER

Sibel DÖŞLER\*, Bülent GÜRLER\*\*, A.Alev GERÇEKER\*

\* İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beyazıt, İSTANBUL

\*\* İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İSTANBUL

### ÖZET

Günümüzde, kliniklerde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin yüksek oranda direnç geliştirmesi, araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bunların arasında en fazla öne çıkan grup, canlıların çevrelerini kuşatan mikroorganizmalara karşı savunmalarında doğal bağışıklığın önemli unsurlarından olan antimikrobik etkili katyonik peptitlerdir. Her tür canlıdan izole edilebilen bu maddelerin geniş spektrumlu antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antitümör ve antiendotoksin gibi çeşitli aktiviteleri ve bunlarla ilgili olarak devam eden pek çok başarılı çalışma bulunmaktadır. Katyonik peptitler özellikle, kullanımda olan pek çok antibiyotiğe karşı yüksek düzeyde dirençli bulunan bakteri suşları üzerine olan etkileri ve antibiyotiklerle meydana getirdikleri sinerjistik etkileri ile oldukça ümit vaat etmektedirler.

**Anahtar sözcükler:** antimikrobik etkili katyonik peptitler, peptitlerin direnç mekanizması, peptitlerin etki mekanizması, peptitlerin yapısı

### SUMMARY

#### Forthcoming Antibiotics: Cationic Peptides with Antimicrobial Activity

Recently, because bacteria develop resistance to antibiotics that are commonly used in clinics, researchers tend to search for new antimicrobial sources. Among these sources, the most remarkable group is the antimicrobial cationic peptides which are the important component in the innate immune response to the surrounding microorganisms. These substances which can be isolated from most of the living organisms, have various activity like broad spectrum antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antitumor and antiendotoxin and there is a lot of continuing study about these activities. Cationic peptides look promising with their activity against especially multi drug resistant bacteria and synergistic reactions with antibiotics.

**Keywords:** antimicrobial cationic peptides, mechanism of action of peptides, mechanism of resistance to peptides, peptide structure

Geçtiğimiz son 50 - 60 yıl boyunca birçok doğal antibiyotik keşfedilmiş, bunların büyük bir bölümü tedavide kullanıma şansı bulmuş ve mucize-hayat kurtarıcı ilaçlar olarak tanımlanmışlardır. Ancak bu antibiyotiklerin kullanıldıkları oran ve sıklıkta, mikroorganizmalar da bunlara karşı direnç geliştirmeye başlamış ve bazı antibiyotikler bu

nedenle kullanım dışı kalmışlardır. Hala kullanımda olanlar ise aynı nedenle bir süre sonra ne yazık ki yetersiz kalacaklardır. Buna karşılık 1960'lerde kinolonların keşfinden sonra, son yıllarda bulunan birkaç antibiyotiğin dışında önemli yeni bir antibiyotik grubu keşfedilememiştir. Bulunan bu antibiyotiklerin de sahip oldukları toksik etkiler ve kısıtlı etki spektrumları

---

**Yazışma adresi:** Sibel Döşler, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beyazıt, İSTANBUL

Tel.: (0212) 440 00 00/13522, (0532) 667 41 29

e-posta:sibeldosler@hotmail.com

Alındığı tarih: 10.10.2005, revizyon kabulü: 17.10.2005

nedeniyle kullanımları sınırlı kalmıştır. Bu durumun gelecekte infeksiyon hastalıklarının tedavisinde büyük sorunlar yaratacağı konusunda endişe duyulmaktadır. Hatta günümüzde bile bazı çok dirençli suşların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde eldeki antibiyotikler yetersiz kalmaktadır. Antibiyotiklerde dirençle ilgili olarak yaşanan bu sorunlar araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bu kaynaklar arasında yer alan ve canlıların çevredeki mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlara karşı en etkili silahları ve doğal bağışıklığın önemli unsurlarından biri olan antimikrobik etkili katyonik peptitler oldukça gelecek vaat etmektedir<sup>(25)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitler mikroorganizmalar, böcekler, amfibiyenler, sürüngenler, kuşlar, bitkiler, çeşitli memeli hayvanlar, insanlar gibi her tür canlıdan elde edilebilirler. Kurbağalardan elde edilen bazı maddeler, yüzyıllarca tedavi amacıyla kullanılan çeşitli ilaçların bileşimine girmiştir; öyle ki kullanımı bazı Güney Amerika ülkelerinde hala devam etmektedir. 1962'de *Bombina variegata* adlı bir kurbağanın yüzey salgılarından, antimikrobik ve hemolitik aktivite gösteren ve daha sonra 24 aminoasitlik bir peptit olduğu belirlenerek "bombinin" şeklinde adlandırılan madde izole edilmiştir. 1972'de *Apis mellifera* adlı balasının venomundan antimikrobik ve hemolitik aktivitelere sahip bir peptit olan "mellitin'in" izole edilmesiyle bu maddenin etki mekanizması üzerinde yoğun çalışmalar başlamıştır<sup>(26)</sup>. 1981'de *Hyolophora cecropia* adında bir çeşit ipek böceğinin hemolenflerinden "sekropin"ler denilen bir grup katyonik peptit izole edilmiş, daha sonra bu madde üzerinde yapılan çeşitli araştırmalar sonunda yapıları ve oluşturdukları etkiler hakkında elde edilen bilgiler, sentez yoluyla ya da klonlanarak sekropin benzeri birçok maddenin elde edilmesini sağlamıştır. 1987'de ise *Xenopus laevis* adlı yaralı bir Güney Afrika kara kurbağasının derisinden "magainin"ler izole edilmiştir. Bu örneklerin dışında memelilerin lökositlerinden "katelisin"ler, vertebralılar ve memelilerin nötrofillerinden "defensin"ler gibi çok çeşitli katyonik peptitler izole edilmiş ve günümüzde bunların sayısı 600'ü aşmıştır<sup>(27)</sup>.

### 1. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin sentezlenmesi

İmmün sistemin infeksiyon etkenine karşı spesifik immün yanıtı oluşturmaya kadar geçen süre içinde mikroorganizmaları etkisiz hale getirebilecek en etkili silahlardan biri olan katyonik peptitler özellikle solunum yolu gibi mukozayla kaplı yüzeylerde bulunan epitel hücreleri ve fagositik hücreler tarafından düşük enerjiyle seri bir şekilde sentezlenmekte ve kolaylıkla büyük miktarlarda saklanabilmektedir. Depo edildiği yerde hazır bekleyen bu peptitler infeksiyondan kısa bir süre sonra yüksek miktarlara ulaşarak birçok mikroorganizma türünün üremesini hızla inhibe etmektedir<sup>(68,69)</sup>. Ayrıca katyonik peptitler birbirleri ile ya da lizozim, laktoferrin gibi

konağa ait diğer doğal savunma faktörleriyle ve çeşitli antibiyotiklerle de sinerjistik etki meydana getirebilirler<sup>(20,50)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitler oldukça homolog bir aileye ait genler tarafından, her peptit için bir gen olacak şekilde kodlanmaktadır. Kromozomlar üzerinde lokalize olarak bulunan bu gen ailesi, ekspresye oldukları dokular ve üretilebilirliklerine göre farklı alt sınıfların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Örneğin insanlarda  $\alpha$  ve  $\beta$  defensinlerin kolokelize oldukları defensin lokusu 8p21 - 23'üncü kromozomda bulunmaktadır.  $\alpha$  ve  $\beta$  defensinlerin üretilmesi için gereken genler her grup için yüksek oranda dizi benzerliği göstermekle birlikte birbirlerinden oldukça farklıdır<sup>(4,46)</sup>.

Genlerde kodlanan katyonik peptitlerin ilk translasyon ürünleri prepropeptitlerdir. Bu prepropeptitler endoplazmik retikulumu hedef alan bir N-terminal sinyal dizisi, bir prosegment ve antimikrobik aktivite gösteren kısım olan bir C-terminal katyonik peptit olmak üzere üç kısımdan ibarettir. Prosegment genellikle anyonik yüklü olup, biyolojik fonksiyonları arasında C-terminalinin doğru bir şekilde katlanması, hücreler arası geçişin düzenlenmesi ve olgun peptitlerin aktivitelere inhibe edilmesi yer almaktadır. Propeptitler hücre içindeki sürecin ileri safhalarında ya da hücre dışına salgılandıktan sonra parçalanırlar. Antimikrobik etkili katyonik peptitler ya propeptit ya da olgun C-terminal peptit şeklinde depo edilirler<sup>(4,46)</sup>.

### 2. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin etki spektrumları

Antimikrobik etkili katyonik peptitler, klasik antibiyotiklerden farklı olarak birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri, mantarları, HIV, herpes simplex ve influenza gibi bazı zarflı virüsleri ve parazitler gibi ökaryot hücreli canlıları da içine alan çok geniş bir etki spektrumuna sahiptirler<sup>(19)</sup>. Bunun yanı sıra bazılarının antitümör, antiendotoksik, hemolitik, kemotaktik, mitojenik, immüno-modülatör, kontraseptif vb. aktivite de bulunabilmektedir<sup>(33)</sup>. Bu maddeler bahsedilen mikroorganizmaların bir ya da birkaçına etkili olabildikleri gibi bazı maddeler tek başlarına da belirtilen tüm bu etkilere sahip olabilmektedirler<sup>(19)</sup>. Ayrıca antimikrobik etkili katyonik peptitlerin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılmaları sonucunda meydana gelen sinerjistik etki ile bu antibiyotiklere dirençli olan suşlara karşı da etkili olabildikleri gösterilmiştir<sup>(20)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitler bakteriler üzerine genellikle düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinde etki ederler ve oluşturdukları öldürücü etki kısa sürede gerçekleştiğinden minimum bakterisit konsantrasyonuna ait değerleri genellikle MİK değerlerinin iki katını geçmemektedir. Bu maddelerin klinik kullanımda olan antibiyotiklere karşı dirençli veya duyarlı olan suşlar üzerine oluşturdukları MİK değerleri arasında ise önemli bir fark bulunmamaktadır. Gösterdikleri bu antimikrobik etki birçok

antibiyotiğin *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi dirençli mikroorganizmalar ya da metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, vankomisine dirençli *Enterococcus*, geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz üreten *Escherichia coli*, çoğul dirençli Gram negatif bakteriler gibi yüksek antibiyotik direnci gösteren türler üzerine olan etkileri ile yarışabilecek düzeydedir. Ayrıca katyonik peptitleri etkileyebilen direnç mekanizmaları da çok azdır ve bunlar genellikle MİK değerini sadece 2 - 4 katına çıkarabilmektedir. Bununla birlikte *Burkholderia cepacia* ve *Serratia* cinsinden türler gibi az sayıda mikroorganizma katyonik peptitlere karşı doğal olarak direnç göstermektedir (23).

### 3. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin yapısal özellikleri

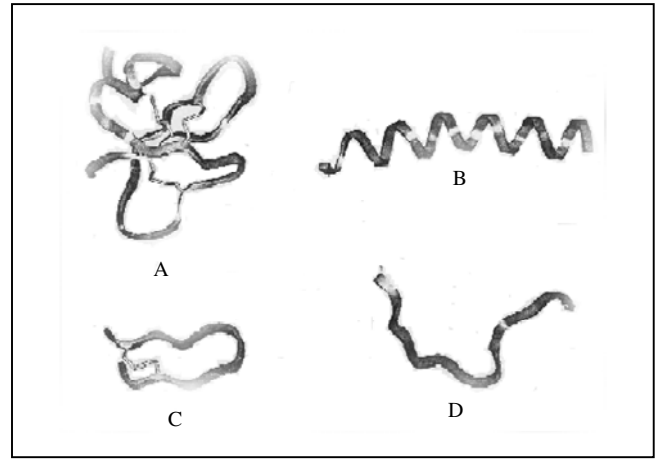
Geçen yüzyılda çok sayıda peptit yapısında antibiyotik tanımlanmış ve bunlar genel olarak iki ana sınıfa ayrılmıştır. İlk grupta non-ribozomal olarak sentezlenen polimiksinler, gramisidinler, basitrasinler ve glikopeptitler gibi antibiyotikler yer almaktadır. Bunlar genellikle mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilen, bazen de bu maddelerin modifiye edilmesi yoluyla elde edilen maddelerdir. İkinci grupta ise ribozomal olarak sentezlenen ve doğal peptitler olarak da adlandırılan antimikrobik etkili katyonik peptitler yer almaktadır. Bunlar bakterilerden insanlara kadar tüm canlılar tarafından sentezlenerek doğal bağışıklık sisteminin en önemli bölümlerinden birini oluşturan maddelerdir(26).

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin yapıları primer ve sekonder yapılar olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Katyonik peptitlerin primer yapısı genellikle 12 - 50 aminoasit uzunluğunda, yaklaşık % 50 oranında hidrofobik aminoasit içeren ve sahip oldukları bazik yapıdaki lizin ve arjinin aminoasitlerinin etkisiyle pozitif yüklü bir yapıdır. Bu pozitif yük genellikle +2 değerinde olup bazen +4, +6 ya da +7 de olabilmektedir. Katyonik peptitlerin sekonder yapısı ise içerdikleri disülfid bağlarının yardımıyla ya da bakteri membranına temas etmeleri sonucunda kendi üzerlerine katlanarak üç boyutlu amfipatik yapıların oluşması suretiyle meydana gelir. Bu yapılar hem polar pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir hidrofobik kısım, hem de non-polar nötral aminoasit yan zincirlerini içeren bir hidrofobik kısımdan oluşmaktadır. Katyonik peptitler bu yapıları ile hidrofobik bir iç kısım ve negatif yüklü hidrofilik dış grupları bulunan bakteri membranıyla çok iyi ilişki kurabilmektedir(19,23). Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin sekonder yapıları aşağıda belirtildiği şekilde dört gruba ayrılmaktadır.

### 3.1. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin sekonder yapıları

**3.1.1.  $\beta$ -şeridi içeren peptitler:** Bu gruptaki peptitlerin karakteristik özellikleri, 16 - 40 aminoasit uzunluğunda olup sisteince zengin olmaları ve yapılarında  $\beta$ -şeridi içermeleridir. İçerdikleri  $\beta$ -şeritleri birbirine iki ya da daha fazla disülfid köprüsü ile bağlanmış antiparalel bir yapıda bulunmaktadır (Şekil 1a).  $\beta$ -şeridi içeren bazı büyük peptitler bu yapıya ilave olarak bazen küçük bir helezonal kısım da içerebilirler(10,56).  $\beta$ -şeridi içeren peptitler birçok bitki ve hayvan türü tarafından sentezlenebilmekte olup birçokunun antibakteriyel olduğu kadar antifungal aktiviteleri de bulunmaktadır. Bu gruptaki peptitler arasında  $\alpha$  ve  $\beta$  defensinler, protegrinler ve takiplesinler sayılabilmektedir(27).

Şekil 1: Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin sekonder yapıları.



A: Üç  $\beta$  şeridi ve küçük bir  $\alpha$ -helezonal kısım içeren peptit (Human  $\beta$ -defensin 2),

B: Amfipatik  $\alpha$ -helezonal peptit (Magainin 2),

C: Halka yapısındaki peptit (Baktesinin),

D: Uzun zincirli peptit (Indolisidin).

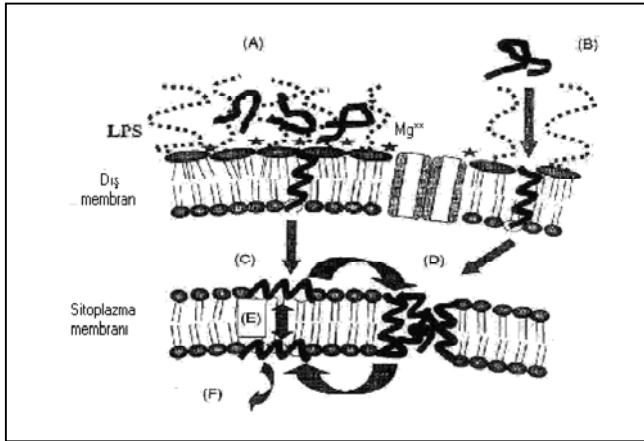
**3.1.2.  $\alpha$ -helezonal peptitler:** Bu gruptaki peptitlerin özellikleri, 20-40 aminoasit uzunluğunda olup sistein içermeksizin lineer ya da  $\alpha$ -helezon yapısında olmaları ve genellikle molekülün merkezinde zayıf bir kıvrım içermeleridir (Şekil 1b).  $\alpha$ -helezonal peptitler arasında mellitin, magaininler, sekropinler, katelisinler, buforin II, LL-37 ve farklı canlılardan izole edilmiş miyeloid antimikrobik etkili peptitler olan PMAP (domuzdan), SMAP (koyundan) ve BMAP (sığırdan) bulunmaktadır(10,27,56).

**3.1.3. Halka yapısındaki peptitler:** Bu gruptaki peptitlerin en belirgin özelliği yapılarında tek bir disülfid, amid ya da izopeptid bağı ile meydana gelmiş bir halka içermeleridir (Şekil 1c). Halka yapısındaki peptitler arasında baktenesin ve tanatin bulunmaktadır<sup>(27,56)</sup>.

**3.1.4. Uzun zincirli peptitler:** Bu grupta yer alan peptitler 40 - 80 aminoasit uzunluğunda olup yüksek oranda pirolin ya da glisin içerirler. Klasik sekonder yapılardan yoksun olan bu peptitler son şekillerini aminoasitler arasındaki bağlar yerine hidrojen ya da Van der Waals bağlarıyla membran lipitleriyle aralarında gerçekleşen etkileşim sonucu alırlar (Şekil 1d)<sup>(27,56)</sup>. Uzun zincirli peptitler arasında indolisidin, PR 39 ve profeninler bulunmaktadır<sup>(10)</sup>.

Yukarıda anlatılan sekonder yapılar arasından doğada en yaygın bulunanlar  $\beta$ -şeridi ve  $\alpha$ -helezon içeren antimikrobik etkili katyonik peptitlerdir. Bununla birlikte yukarıda söz edilen grupların dışında da bazı katyonik peptitler bulunmaktadır. Bunlar laktoferrin, bakterisidal permeabilite artırıcı protein (BPI) ya da tavuk ovatransferrin gibi molekül ağırlığı daha büyük olan katyonik proteinlerin proteolitik olarak sindirilmeleri ile meydana gelebilirler. Bu tip peptitlere örnek olarak laktoferrisin B verilebilir<sup>(10,27)</sup>.

**Şekil 2:** Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi.



A: Katyonik peptitlerin LPS'deki iki değerli katyonlarla yer değiştirerek kendi destekledikleri yolla dış membrandan geçişleri,

B: Katyonik peptitlerin LPS'deki katyon bağlayıcı noktalara bağlanarak kendi destekledikleri yolla dış membrandan geçişleri,

C: Katyonik peptitlerin sitoplazma membranına paralel olarak bağlanması,

D: Katyonik peptitlerin membranda birikerek agregatlar oluşturması,

E: Katyonik peptitlerin sitoplazma membranında kanallar oluşturması,

F: Katyonik peptitlerin sitoplazma membranından geçerek hücre içine girmesi.

#### 4. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin etki mekanizmaları

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin pozitif yüklü ve

hidrofobik olması bu maddelerin bakteri membranıyla etkileşime girmeleri için çok önemlidir. Katyonik peptitlerin birçoğu bu özelliklerinden dolayı herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın direkt olarak negatif yüklü olan bakteri yüzeyine bağlanarak etkisini gösterir. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ve Gram pozitif bakterilerde bulunan ve asidik bir polisakkarit olan lipoteikoik asit, katyonik peptitlerin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yükü temin eder. Ayrıca bakterilerin fosfolipit yapısındaki iç membranının da negatif yüklü oluşu antimikrobik etkiyi kolaylaştırmaktadır<sup>(24,61)</sup>.

Memelilerde bulunan ökaryot hücrelerin dış membranı, bakteri hücresinden farklı olarak fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi elektriksiz olarak nötral, zwitteriyonik fosfolipitlerden yapılmıştır. Bakteri dış membranı ise negatif yüklü fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşmaktadır. Ayrıca memeli hücrelerinde kolesterol bulunurken bakterilerin dış membranında bulunmamaktadır. Bu farklılıklar, antimikrobik etkili katyonik peptitlerin insan hücreleri üzerine önemli bir toksik etkileri olmaksızın bakteriler üzerindeki seçici öldürücü etkilerini açıklamaktadır<sup>(41,43)</sup>.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, birçok antimikrobik etkili katyonik peptitler bakteriler üzerindeki öldürücü etkilerini yapılarına, hidrofobikliklerine, büyüklüklerine veya aminoasitlerinin dizilişlerine bağlı olmaksızın küçük miktarda dahi gerçekleştirebilmektedirler. Bu etki tüm katyonik peptitlerin benzer bir mekanizma ile fosfolipit yapısındaki negatif yüklü sitoplazma membranına bağlanması ve bakteriye nüfuz etmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşimin sonucunda bakteri hücresinin membranında, hücre içi ile dış ortam arasında iyonlar ve sıvılar için bir geçiş yolu meydana gelir. Ancak katyonik peptitlerin sitoplazma membranına ulaşabilmesi için öncelikle Gram negatif bakterilerin LPS içeren dış membranını veya Gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asit içeren hücre duvarını geçmeleri gerekmektedir<sup>(28,41)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitler, Gram negatif bakterilerin LPS yapısındaki dış membranını geçmek için aminoglikozitler ve polimiksinler gibi polikatifonik antibiyotiklerin hücre içine alınmak üzere kullandıkları yola benzer bir şekilde kendi geçişlerini destekleyen yolu kullanırlar<sup>(59)</sup>. Bu yolla hücre içine girişin mekanizmasına göre pozitif yüklü olan katyonik peptit şekil 2a'da görüldüğü gibi ilk olarak negatif yüklü ve polianyonik bir yüzey olan LPS ile etkileşir. Katyonik peptitlerin LPS'e olan afiniteleri iki değerlikli katyonlar olan ve LPS'i bir arada tutan  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ 'dan üç kat daha fazla olduğu için peptitlerle bu iyonlar yarışmalı olarak yer değiştirirler. Bunun sonucunda katyonik peptitler hücre yüzeyinde birikerek LPS'i kısmen nötralize eder ve dış membranın normal bariyer bütünlüğünü bozarlar. Bütünlüğünü yitirmiş dış membran bu şekilde hidrofobik yapılar, küçük

proteinler, antimikrobik maddeler ve en önemlisi katyonik peptitler için geçirgen hale gelir. Böylece katyonik peptitler kendi destekledikleri yolla dış membrandan geçerek fosfolipit yapıdaki sitoplazma membranına ulaşmış olurlar<sup>(59)</sup>. Bu mekanizma aynı zamanda katyonik peptitlerin LPS'lerin serbest şekilleri olan endotoksinlere bağlanıp bunları inhibe ederek nasıl antiendotoksin aktivitesi gösterdiklerini ve antibiyotiklerle ne şekilde sinerjist etki oluşturduklarını da açıklamaktadır<sup>(23)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin kendi destekledikleri yolla bakterinin dış membranından geçmesi, bu maddelerin öldürücü etkileri için gerekli fakat yeterli değildir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için asıl öldürücü olan katyonik peptitlerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında katyonik peptitlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelir, peptitler şekil 2c'de görüldüğü gibi membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açarlar (Şekil 2e)<sup>(25,28)</sup>. Bu olayı açıklamak için çok sayıda model membran çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda çeşitli mekanizmalar tanımlanmış, bu mekanizmalardan başlıcaları aşağıda özetlenmiştir<sup>(34,40,79)</sup>.

#### 4.1. Fıçı tahtası modeli

Fıçı tahtası modelinde farklı sayıdaki peptitler membranın iç kısmında bir halka görünümünü verecek şekilde yerleşirler. Membranda kanalların oluşmasını sağlayan bu peptit moleküllerinin herbiri fıçıyı oluşturan tahtalara benzetilmektedir. Membranın bu şekildeki görünümü nedeniyle bu modele fıçtahtası modeli adı verilmiştir<sup>(76)</sup>.

Fıçtahtası modeli, amfipatik  $\alpha$ -helezon yapısındaki katyonik peptitlerden oluşan bir peptit yığını tarafından gerçekleştirilmektedir. Tek bir amfipatik  $\alpha$ -helezon yapısındaki peptidin monomer halinde membranın içinden geçmesi enerji bakımından uygun değildir. Teorik olarak her por en az üç peptit molekülü tarafından oluşturulabilir. Bu modelde peptitlerin hidrofilik yüzleri çözücü ile, hidrofobik yüzleri ise membranın lipit kısmı ile temas eder ve sonuçta membranda kanallar ya da porlar meydana gelir. Fıçtahtası modeline uygun şekilde etki gösteren peptitler, amfipatik  $\alpha$ -helezon yapısı dışında hidrofobik  $\alpha$ -helezonal,  $\beta$ -şeridi ya da hem  $\alpha$ -helezon hem  $\beta$ -şeridi içeren peptitlerden oluşan bir yığın şeklinde de bulunabilirler. Bu modele göre etki eden peptitler arasında pardaksin, alametisin ve  $\alpha$ -5-helezon  $\delta$ -endoksin bulunmaktadır<sup>(64)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin fıçtahtası modeline göre etki edebilmeleri için öncelikle bakterinin membranına monomer ya da multimerleri halinde bağlanmaları ve membrana bağlı durumdayken birbirlerini tanımları

gerekmektedir. Fıçtahtası modelindeki kritik basamak peptitlerin membrana bağlı durumdayken birbirlerini tanımlarıdır. Daha sonra peptit molekülleri ile membranda bulunan lipit moleküllerinin etkileşime girmesi sonucunda peptitler membranın hidrofobik kısmına geçerler. Oluşan yapıya yeni monomerler veya küçük oligomerlerin de eklenmesi sonucunda porların genişlikleri artar. Bu şekilde etki eden peptitler hedef hücredeki fosfolipit membrana bir kez penetre olduktan sonra çok düşük konsantrasyonlarda dahi olsa bakteriyi öldürebilmektedirler<sup>(48,64)</sup>.

#### 4.2. Kilim modeli

Bu model ilk olarak dermaseptin S'nin etki mekanizmasını açıklamak için ortaya çıkarılmış ve daha sonra doğal dermaseptin analoglarının, sekropinlerin, insana ait antimikrobik etkili bir peptit olan LL-37'nin, kaerin 1.1'in, trikoginin ve litik peptitlerin diastereomerlerinin de bu şekilde etki ettikleri gösterilmiştir. Kilim modeline göre bakteri hücresinin negatif yüklü yüzeyinde bulunan fosfolipit grupları ile pozitif yüklü peptit monomerleri arasındaki ilk etkileşim elektrostatik olarak gerçekleşir. Peptit monomerlerinin hidrofilik yüzleri membrandaki fosfolipit gruplarıyla karşılıklı gelecek şekilde hedef hücrenin yüzeyine bağlanarak hücreyi bir kilim gibi örterler. Bu durumdaki peptitler yeterli konsantrasyona ulaştıktan sonra peptit molekülleri dönerek membranın hidrofobik kısmına doğru bakacak şekilde yeniden yerleşirler ve deterjanlara benzer bir etki göstererek membranın parçalanmasına yol açarlar<sup>(48,64)</sup>.

Kilim modelinde fıçtahtası modelinin aksine pozitif yüklü peptitler membranın hidrofobik kısmının içine girmezler, onun yerine hidrofilik kısımları birbirine bakacak şekilde bir topluluk halinde bulunurlar. Ayrıca bu mekanizmaya göre membrana nüfuz eden peptitlerin belirli bir yapıda olmaları zorunlu değildir, çeşitli sekonder yapılarda, büyüklüklerde, lineer veya siklik şekilde bulunabilirler<sup>(64,76)</sup>.

#### 4.3. Miçel agregat modeli

Miçel agregat modelinde değişik sayıdaki peptit molekülü tarafından oluşturulan topluluklar, konsantrasyonlarına ve sitoplazma membranının elektrik potansiyeline bağlı olarak membranda yeniden yerleşirler. Bu topluluklar membran boyunca miçellere benzeyen bölgesel agregasyonlar meydana getirerek iyonların geçişi için normal olarak membranda bulunmayan kanalların açılmasına neden olurlar (Şekil 2d). Model membran çalışmalarına göre, oluşan bu kanallar çeşitli büyüklük ve ömürlerde olmakla beraber genellikle mikrosaniyeler içinde yok olurlar<sup>(56)</sup>. Kurbağadan elde edilen ve antimikrobik etkili bir peptit olan buforin II'nin membranlardan geçişini bu modele göre gerçekleştirdiği gösterilmiştir<sup>(49)</sup>.

#### 4.4. Toroidal model

Toroidal modelin fiçı tahtası modelinden farkı peptitlerin lipit membran içinde dikey olarak bulunmaları ve her zaman membranın lipit grupları ile birarada bulunarak porları oluşturmalarıdır. Toroidal modele göre etki eden  $\alpha$ -helezonal peptitler membrana paralel bir konum aldıktan sonra peptitlerin hidrofobik amino asit grupları ile membranın polar grupları yer değiştirirler. Bu durum, membranın hidrofobik kısmında membrana dik olarak bulunan ve peptit ve lipit grupları boyunca uzanan yarıkların oluşmasına neden olmaktadır. Bu modele göre etki eden peptitler arasında magaininler ve mellitin bulunmaktadır<sup>(75,76)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin hücre içine girdikten sonra oluşturdıkları öldürücü etkilerinin, parçalanmış membranın gösterilmesinin dışında farklı şekillerde de görülebildiğine dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunların arasında spesifik membran proteinlerinin sentezinin durdurulması (atasinler ve gloverin), stres proteinlerinin sentezlenmesi, DNA sentezinin bloke edilmesi (PR-39), tek zincirli DNA'nın parçalanması (defensinler), DNA ile etkileşime girerek çeşitli hücrel olayların engellenmesi (buforinler) ya da hidrojen peroksit üretiminin tespit edilmesi sayılabilir<sup>(3,5,8,16)</sup>. Katyonik peptitler, ökaryot hücrelerdeki apoptoz ya da bakterilerdeki otoliz gibi kendi kendini yok etme mekanizmalarını da harekete geçirebilmektedirler. Bunlardan apoptoz laktoferrisin ve sekropin-mellitin hibriti CA(1-8)M(1-18) için, otoliz ise peptidoglikanı parçalayan amidazların harekete geçirilmesi yolu ile lantibiyotikler (lantionin içeren peptit antibiyotikler) grubundan olan nisin ve pep5 için tanımlanmıştır<sup>(7,72,77)</sup>. Ayrıca bazı peptitlerin etki gösterdiği bazı spesifik enzimatik hedefler de tanımlanmıştır. Örneğin pirolince zengin bir böcek peptiti olan prikorisin, şaperon destekleyici proteini inhibe eden bir protein olan ısı şok proteini DnaK'yı inhibe ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde lantibiyotikler sınıfından olan nisin ve mersasidin ise peptidoglikan biyosentezinde rol alan en önemli maddelerden biri olan lipit II'ye bağlandıkları gösterilmiştir. Membran aktif peptitler etkilerini birkaç dakika içinde gösterirken, bu şekilde etki eden peptitlerin etki süreleri daha uzundur. Bu süre prikorisin için bir saat, mersasidin için ise üç saati bulmaktadır<sup>(9,74,76)</sup>.

Sonuç olarak antimikrobik etkili katyonik peptitlerin, bakteri hücresinde sitoplazma membranının oluşturduğu bariyer, hücre duvarının sentezi ya da yıkımı, hücrenin bölünmesi, makromoleküllerin sentezi ya da çeşitli enzimler gibi hedef aldığı bölgeler veya safhalar bulunmaktadır. Bu kadar çeşitli hedefin varlığı, bakterilerin katyonik peptitlere karşı neden zor direnç geliştirdiklerini açıklamaya da yardımcı olmaktadır<sup>(2)</sup>.

#### 5. Antimikrobik etkili katyonik peptitlere karşı direnç mekanizmaları

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin etki mekanizması ve hedef aldığı çeşitli hücre içi yapılar nedeniyle bunlara karşı direnç gelişmesi kolay olmasa da bunun hiçbir zaman meydana gelmeyeceğini söylemek gerçekçi değildir. Bununla birlikte bazı mikroorganizmalar yapısal özellikleri dolayısıyla antimikrobik etkili katyonik peptitlere karşı doğal olarak dirençlidirler. Antimikrobik etkili katyonik peptitlere karşı bu şekilde direnç gösteren bakteriler arasında *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* ve *Burkholderia* türleri sayılabilmektedir<sup>(76)</sup>.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin potansiyel klinik kullanımlarını ve etki mekanizmalarını sınırlayabilecek en önemli durumlar arasında, bunların vücutta bulunan proteinazlarca inaktive edilmeleri ve bu şekilde bu maddelere karşı ortaya çıkabilecek direnç yer almaktadır. Bu alanda en fazla yapılan çalışmalar dirençli mutantların oluşumu ve bunların genetik özelliklerinin araştırılması konusundadır<sup>(38,39,54)</sup>. Birçok çalışmada katyonik peptitlere karşı gelişen direncin virülans genleri ile ilgili olduğu varsayılırsa da bu düşünce her zaman geçerli değildir. Bu konuda tartışılan çeşitli mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir<sup>(2,76)</sup>.

##### 5.1. Hücre içine girişin engellenmesi

**5.1.1. Bakteri dış membranı tarafından hücre içine girişin engellenmesi:** Gram negatif bakterilerde dış membranın ana bileşenini LPS'ler oluşturur ve antimikrobik etkili katyonik peptitler etkilerini LPS'e bağlanıp kendi geçişlerini denetleyen yolu kullanarak bakteri hücresine girmeleri sonucunda gösterirler<sup>(59)</sup>. Katyonik peptitlerle LPS arasında elektrostatik olarak gerçekleşen bu tanıma ve bağlanma olayının engellenmesi LPS'in bulunmaması ile olabilir ki, buna örnek olarak bakterisine dirençli *Borrelia burgdorferi* suşları verilebilir<sup>(60)</sup>. Bir diğer direnç gelişimi LPS'de bulunan fosfat gruplarının esterlenmesi ile negatif yükün azalması şeklinde olabilir ki buna örnek olarak da katyonik peptitlere karşı doğal olarak dirençli bakteriler olan *Proteus* ya da *Burkholderia* türleri verilebilir<sup>(13,32,65)</sup>. Ayrıca, Gram negatif bakterilerin dış membranından geçerken önemli bir giriş yolu olan LPS'e bağlanmak yerine bazı peptitlerin membranın diğer bileşenlerini tercih etmeleri, bunların etkisiz kalmalarına neden olabilmektedir. Buna örnek olarak patojen *Yersinia* türlerinin defensinlere ve poliLys, poliOrn, sekropin PI, mellitin ve polimiksin B'ye karşı gösterdikleri direnç verilebilir<sup>(6,73)</sup>. Ayrıca *Haemophilus influenzae*'nin dış membranında yer alan LPS'in yapısında fosforikolin bulunmasının da LL-37/hCAP18 peptidine karşı direnç gelişmesinde etkisinin olduğu gösterilmiştir<sup>(37)</sup>.

Gerek bakteriler üzerinde yapılan çalışmalar gerekse model membran çalışmaları olsun, membranın elektriksel

potansiyelinin artmasının antimikrobik etkili katyonik peptitlerin hücre içine daha yüksek oranda nüfuz etmesini sağladığını göstermektedir. Örneğin, amfipatik bir peptit olan H9c2'nin, membran potansiyelindeki artışa paralel olarak fare embriyo miyoblastı üzerine yüksek oranda aktivite gösterdiği bildirilmiştir<sup>(51)</sup>. Benzer şekilde eritrositlerin hiperpolarizasyonu bunların magaininlere duyarlılığını arttırırken, *Leishmania*'da potasyum gradientinin düşürülmesi sekropin A-mellitin hibritinin aktivitesini düşürmektedir<sup>(15)</sup>. Yüksek düzeydeki tuz konsantrasyonu da elektrostatik etkileşmeyi inaktive etmektedir. Özellikle *P.aeruginosa* suşlarına karşı başta polimiksinler olmak üzere çeşitli katyonik peptitlerin aktiviteleri, ortamdaki tuz konsantrasyonunun artmasıyla azalmaktadır<sup>(18)</sup>.

**5.1.2. Sitoplazma membranı tarafından hücre içine girişin engellenmesi:** Antimikrobik etkili katyonik peptitler esas hedeflerine ulaşabilmek için öncelikle bakterilerin peptidoglikan tabakasını, anyonik yapıdaki oligosakkarit zincirleri ya da ökaryotik hücrelerin ekstraselüler matriksi gibi çeşitli bariyerleri geçmek zorundadır. Bunlardan ekstraselüler matriksin belli başlı yapısını oluşturan heparin, defensinlerin tümörisidal aktivitesini ve sekropin A - mellitin hibritinin nüfuz etme yeteneğini inhibe etmektedir. Benzer şekilde eritrositlerin membran glikoproteinlerinde bulunan siyalik asit, magainin ve mellitine karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır<sup>(36,44)</sup>. Ayrıca, *S.aureus* ve *Staphylococcus xylosus*'un lipoteikoik asitlerinde bulunan D-alanin gruplarının esterlenmesi sonucu bu suşların defensinler, protegrinler, takiplesin ve magainin II gibi çeşitli katyonik peptitlere karşı dirençli hale geldikleri bildirilmiştir<sup>(53,54)</sup>.

Bakteri membranında bulunan anyonik fosfolipitlerin düşük miktarda bulunmalarının da, katyonik peptitlere karşı direnç gelişimi ile ilgisi olduğu gösterilmiştir. Örnek olarak katyonik peptitlere karşı doğal olarak dirençli olan *Serratia* türleri ya da çeşitli Gram negatif bakterilerin sferoplast şekilleri verilebilir<sup>(70)</sup>. Sapesinin *S.aureus* üzerine *E.coli*'den daha fazla etkili oluşu da *S.aureus*'un dış membranındaki kardiyolipin içeriği ile bağdaştırılmıştır ki, bu maddenin eksik olduğu mutant suşlarda da direnç görülmektedir<sup>(42)</sup>.

## 5.2. Peptitlerin proteolizi

Bu mekanizma ile ortaya çıkan direnç belki de antimikrobik etkili katyonik peptitlerin klinik kullanımını etkileyebilecek en önemli mekanizmadır. Peptitlerde bulunan yüksek miktardaki bazik yapıli aminoasitler, tripsin ve benzeri proteinazlar tarafından kolayca parçalanabilmektedir. Patojen bakteri türlerinde bulunan proteinazların seviyesi ile bu bakterilerin virülansları orantılıdır. Örneğin, bazı *P.aeruginosa* türleri ve balarılarında bulunan *Bacillus larvae* gibi patojenlerde

sekropine özgü parçalayıcı enzimler bulunmaktadır<sup>(29,30)</sup>. Benzer şekilde *Salmonella*'larda magainine karşı magaininaz benzeri aktiviteye sahip metalloproteinazlar ve *Salmonella enterica*'da katelidisine karşı etkili proteazlar tanımlanmıştır<sup>(52,58)</sup>. Ayrıca *E.coli* ve *S.aureus*'da laktoferrisin B'ye karşı görülen direncin de proteazlarla bağlantılı olduğu gösterilmiş, bunun yanı sıra *S.aureus*'da LL-37'yi parçalayan aerolizin adlı metalloproteinaz tanımlanmıştır<sup>(66,71)</sup>.

## 5.3. Peptitlerin hücre dışına pompalanması

Bazı bakterilerde, hücre dışına pompa sistemi olarak adlandırılan ve protonların itici gücüne bağlı olarak çeşitli antibiyotiklere, organik boyalara ve dezenfektanlara karşı direnç görülmesine neden olan sistemler tanımlanmıştır. Aynı şekilde antimikrobik etkili katyonik peptitlere karşı da, peptitin hücre içine girip öldürücü etkisini göstermesine fırsat vermeden hücre dışına pompalanmasını sağlayan sistemler tanımlanmıştır. Örneğin, *Neisseria gonorrhoeae*'da görülen protegrin, takiplesin ve LL-37 direnci, diğer çoğul ilaç direncini sağlayan pompalar gibi çalışan ve mtr genine bağlı olan bir hücre dışına pompa sisteminden kaynaklanmaktadır. *Yersinia* türleri ve stafilkokoklar için de benzer bir mekanizma ortaya çıkarılmıştır<sup>(52,63,76)</sup>.

## 5.4. Hücre içindeki hedeflerin değişikliğe uğraması

Bazı antimikrobik etkili katyonik peptitler öldürücü etkilerini çeşitli hücre içi bileşenlerini etkilemek suretiyle göstermektedirler. Bu hedeflerde meydana gelebilecek değişiklikler katyonik peptitlerin etki etmesini engelleyebilmektedir. Örneğin, *E.coli*'deki gyrB geninde meydana gelen bir mutasyon, mikrosin B17'nin hedef aldığı DNA giraz enziminde değişiklik yaparak bakterinin bu maddeye karşı duyarlılığını belirgin bir şekilde azaltmasına yol açmaktadır<sup>(14,76)</sup>.

İlk keşfedilen antibiyotik olan penisilinin klinik kullanıma girmesinden hemen sonra bu maddeye karşı direncin gelişebildiği ortaya konulmuştur. Penisilin, ilaç olarak kullanılmaya başlandığı sıralarda doğada kendisine karşı dirençli mutantların gelişimine izin verecek kadar fazla miktarda sentezlenmemekteydi. Ancak penisilinlerin yaygın şekilde kullanılmaya başlanmasının ardından dirençli suşlar seçilerek hızla çoğalmaya başlamış ve bu durum penisilinin kullanımını oldukça sınırlamıştır. Diğer antibiyotik grupları da benzer şekilde direnç problemi ile karşı karşıyadırlar. Katyonik peptitler ise milyonlarca yıldır doğada birçok canlı tarafından bol miktarda sentezlenerek kullanılmaktadır ve buna rağmen bu maddelere karşı önemli bir direnç gelişimi söz konusu olmamıştır. Bu durum, gelecekte de antimikrobik etkili katyonik peptitlerin direnç gelişimi konusunda ciddi bir sorun yaşanmaksızın önemli bir antibiyotik grubu olarak insanlığa hizmet edeceğinin göstergesidir<sup>(78)</sup>.

## 6. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin klinik kullanımları

Mikroorganizmalar tarafından non-ribozomal yolla üretilen antimikrobik etkili katyonik peptitler olan gramisidin S ve polimiksin B, günümüzde topikal krem ve solüsyonlarda kullanılmaktadır. Bu maddelerin toksik etkiye sahip olmaları sistemik kullanımlarına izin vermemektedir. Ancak polimiksin E'nin amino gruplarının metansülfonatla nötralize edilmesi sonucu elde edilen ve düşük toksik etkili bir türevi olan kolimisin, parenteral ve aerosol formlarında sistemik olarak da kullanılabilir (27,31).

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin klinikteki kullanım alanlarını bulmakla ilgili çok sayıda çalışma devam etmektedir. Bunlar arasında bir magainin türevi olan MSS-78 (Cytalex; Magainin Pharmaceuticals Inc., Plymouth Meeting, Pa.) ile yapılan faz III klinik çalışmalarında bu maddenin etkisi toplam 926 polimikrobik diyabetik ayak ülseri bulunan hasta üzerinde topikal olarak denenmiştir. Sonuçta, uygulanan bu tedavinin oral ofloksasin tedavisiyle eşdeğer olduğu ve çok daha az yan etkinin görüldüğü bildirilmiştir (35).

Protegrin benzeri bir peptit olan IB-367 ile yapılan faz I klinik çalışmalarında bu madde sağlıklı kişilerde, ağızdaki mukoza iltihabına neden olan mikroorganizmalar üzerine lokal olarak kullanılmıştır. Sonuçta IB-367'nin Gram pozitif bakteri yükünü 3-log düşürdüğü, Gram negatif bakteri ve mayaların sayısında da belirgin bir azalma meydana getirdiği, bunun yanı sıra herhangi bir yan etkisinin ise görülmediği bildirilmiştir (45). Aynı madde ile yapılan faz III klinik çalışmalarında ise bu maddenin aerosol formu sağlıklı kişilerde ve *P.aeruginosa*'nın etken olduğu akciğer infeksiyonu bulunan kistik fibrozlu hastalarda denenmiştir. Elde edilen bulgular IB-367'nin hasta grubunda bulunanlarda bakteri yükünü oldukça azalttığını, bunun yanı sıra önemli bir yan etkisinin ise bulunmadığını göstermiştir (17).

Nisinin kullanıldığı hayvan modellerinde bu maddenin ineklerin meme ucu derisine bir dakikalık teması sonucunda, bu bölgede bulunan bakterilerden *S.aureus*, *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin sayısını 4-log düşürdüğü ve herhangi bir yan etki oluşturmadığı görülmüştür (62).

Bir solunum yolu patojeni olan *Mannheimna (Pasteurella) haemolytica* ile kuzularda akut pnömoninin oluşturulduğu bir başka çalışmada, kuzulara bronşiyal inhalasyonla 0.5 mg'lık tek doz SMAP 29 (koyundan elde edilen miyeloid antimikrobik peptit) verilmiş ve bu uygulamanın bronkoalveolar lavaj sıvısında ve akciğer dokularında bulunan bakteri konsantrasyonunu oldukça düşürdüğü gözlenmiştir (11).

Bunlar dışında 12 - 18 aminoasitlik bir peptit olan sekropin A - mellitin hibritinin tavşanlarda *P.aeruginosa*'nın etken olduğu göz infeksiyonlarında etkili olduğu bildirilmiştir (47). Ayrıca sistemik infeksiyonlarla yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -helezonal peptitler olan MBI-27 ve MBI 28'in *Paeruginosa*'-

nın neden olduğu peritonal infeksiyonlarda;  $\beta$ -şeridi içeren protegrinin (PG-1) metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarının, vankomisine dirençli enterokokların (VRE) ve *P.aeruginosa* suşlarının neden olduğu intraperitonal infeksiyonlarda; uzayan bir helezon yapısına sahip olan indolisidin ise lipozomal formlarının farede oluşturulan *Aspergillus*'a bağlı mantar infeksiyonlarında etkili buldukları belirlenmiştir (1,67).

Giacometti ve ark.(21)'nin yapmış oldukları bir çalışmada farelerde oluşturulan septik şok modellerinde indolisidin ve bufurin II'nin hem bakteri üremesini, hem de endotoksin ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonunu belirgin bir şekilde düşürdükleri belirtilmiştir. Cirioni ve ark.(12)'nin yapmış oldukları benzer bir çalışmada yine farelerde *E.coli* ile meydana getirilen septik şok modelinde magainin I, magainin II ve magainin II-amidin gerek tek başlarına gerekse piperasilin ile oluşturulan kombinasyonlarının bakteri yükünü, plazmadaki endotoksin seviyesini ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonunu belirgin bir şekilde azalttıkları saptanmıştır.

Yapılan bu çalışmalar antimikrobik etkili katyonik peptitlerin yakın gelecekte geleneksel antibiyotiklere dirençli bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan ciddi infeksiyonların tedavisinde enjeksiyon yoluyla da güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bunu destekleyen en önemli çalışmalardan biri nötrofillerce üretilen bir katyonik protein olan rBPI<sub>21</sub> (bakterisidal/geçirgenliği artırıcı protein olan BPI'nin modifiye şekli, Neuprex)'in intravenöz olarak kullanılabilmesidir. Şu anda faz III klinik çalışma aşamasında olan bu maddenin faz II klinik çalışması sırasında pediatrik *Neisseria meningitidis* infeksiyonlarında ölüm oranını hayli düşürdüğü ve 700'den fazla hastada güvenle kullanıldığı rapor edilmiştir (22). Bu proteinden türetilen küçük katyonik peptit yapısındaki maddeler de intravenöz uygulama ile benzer bir antimikrobik aktivite göstermektedir. Bu da katyonik peptitlerin yakın gelecekte sistemik olarak da kullanılabilen oldukça önemli bir antibiyotik grubu olacağını düşündürmektedir (57).

Bazı katyonik peptitlerin antimikrobik aktiviteleri dışında kontraseptif olarak kullanılma potansiyelleri de bulunmaktadır. Magaininlerin sperm öldürücü özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada magainin A farelerde 50  $\mu$ g, tavşanlarda 400  $\mu$ g, maymun ve insanlarda ise 800  $\mu$ g'lık miktarlarda spermleri % 100 oranında hareketsiz hale getirmiştir. Bir başka çalışmada 300 - 400  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki nisinin 20 saniyede insan spermlerini tamamen hareketsiz hale getirdiği gözlenmiştir. Hayvan modellerinde ise farelerde 200  $\mu$ g, tavşan ve maymunlarda ise 1 mg magainin A'nın ya da tavşanlarda 1 mg nisinin vajinal olarak uygulanması ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir (57).

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin klinikte kullanımına karar verirken bunların toksisitesi, stabilitesi, immün



sisteme etkileri, kullanım şekilleri ve formülasyonları göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak bu konular üzerinde yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Çeşitli ilaç firmaları tarafından yapılan çalışmaların yanı sıra daha fazla akademik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Örneğin Ahmad ve ark.<sup>(1)</sup> ve Hancock<sup>(23)</sup>, bu konudaki en önemli noktanın antimikrobik etkili katyonik peptitlerin farmasötik formülasyonu olduğunu, bir diğer önemli nokta olarak ise peptitlerin stabilitesinin vücutta bulunan proteazların parçalayıcı etkilerine karşı korunması gerektiğini vurgulamışlardır. Bunun dışında araştırmacılar akut toksisitenin çok önemli bir sorun olarak gözükmeye başladığını ancak uzun sürede yavaş gelişebilecek bir toksisitenin varlığının da araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin yaygın olarak kullanılmalarının önündeki bir engel de maliyetleridir. Genel olarak bu maddelerin üretimi için doğal kaynaklar pek ekonomik değildir. Ayrıca bazı kaynaklardaki doğal katyonik peptitler, sentez yoluyla geliştirilen türevlerine oranla daha dar bir etki spektrumuna sahiptirler. Bu durumun bir istisnası nisindir. Nisin *Lactococcus lactis*'den fermentasyon yolu ile bol miktarda üretilebilmektedir. Sentetik peptitler için ise otomatik peptid sentezleyicilerle ya da rekombinant DNA teknolojisi ile sentez yöntemleri geliştirilmektedir<sup>(27, 55)</sup>.

Son yıllarda üzerlerinde yoğun olarak çalışılmaya başlanan ve antibiyotiklere dirençli birçok mikroorganizmaya karşı etkili bulunan antimikrobik etkili katyonik peptitlerin, dirençli suşlarla meydana gelen çeşitli infeksiyonların tedavisi için gelecekte yeni ve etkili bir antibiyotik grubu olarak diğerlerinin arasında ilk sıralarda yer alacağı düşünülebilir. Ancak bu maddelerin ilaç olarak patent alıp klinik kullanıma girebilmeleri için antimikrobik aktivitelerinin yanı sıra farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri belirlenmeli, olası stabilite ve toksisite gibi problemleri giderilmeli ve yeterli dozda etken madde içeren uygun formülasyonları hazırlanmalıdır. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerle yapılan gerek hayvan modeli çalışmaları gerekse insanlar üzerinde yapılan faz II, faz III klinik çalışmalarında alınan sonuçlar son derece ümit vericidir. Ancak yine de bu çalışmaların sayıları henüz çok sınırlıdır ve daha fazla in-vivo ve in-vitro çalışma ile desteklenmeleri gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Ahmad I, Perkins WR, Lupan DM, Selsted ME, Janoff AS: Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity, *Biochim Biophys Acta* 1995;1237:109.
2. Andreu D, Rivas L: Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* 1998;47:415.
3. Axen A, Carlsson A, Engstrom A, Bennich H: Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae, *Eur J Biochem* 1997;247:614.
4. Bals R: Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection, *Respir Res* 2000;1:141.
5. Bateman A, Singh A, Congote LF, Solomon S: The effect of HP-1 and related neutrophil granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells, *Regul Pept* 1991;35:135.
6. Bengoechea JA, Diaz R, Moriyon I: Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides, *Infect Immun* 1996;64:4891.
7. Bierbaum G, Sahl HG: Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes, *Arch Microbiol* 1985;141:249.
8. Boman HG, Agerberth B, Boman A: Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine, *Infect Immun* 1993;61:2978.
9. Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl H, de Kruijff B: Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic, *Science* 1999;286:2361.
10. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF: Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences, *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:465.
11. Brogden KA, Kalfa VC, Ackermann MR, Palmquist DE, McCray PB Jr, Tack BF: The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:331.
12. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R et al: Single-dose intraperitoneal magainins improve survival in a Gram-negative-pathogen septic shock rat model, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:101.
13. Cox AD, Wilkinson SG: Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance, *Mol Microbiol* 1991;5:641.
14. del Castillo FJ, del Castillo I, Moreno F: Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase, *J Bacteriol* 2001;183:2137.
15. Diaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas L: The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-18), a synthetic cecropin A-mellitin hybrid peptide, *Biochem J* 1998;330:453.
16. Engstrom P, Carlsson A, Engstrom A, Tao ZJ, Bennich H: The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*, *EMBO J* 1984;3:3347.
17. Fricker J: A natural antibiotic for cystic fibrosis, *Drug Discov Today* 2002;7:159.
18. Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock RE: Salt-resistant alpha helical cationic antimicrobial peptides, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1542.
19. Ganz T, Lehrer RI: Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications, *Mol Med Today* 1999;5:292.

20. Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Paggi AM, D'Errico MM, Scalise G: Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Peptides* 2001;21:1155.
21. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R et al: Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2132.
22. Giroir BP, Scannon PJ, Levin M: Bactericidal/permeability-increasing protein-lessons learned from the phase III, randomized, clinical trial of rBPI21 for adjunctive treatment of children with severe meningococemia, *Crit Care Med* 2001;29:130.
23. Hancock RE: Peptide antibiotics, *Lancet* 1997;349:418.
24. Hancock RE: The bacterial outer membrane as a drug barrier, *Trends Microbiol* 1997;5:37.
25. Hancock RE: Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet Infect Dis* 2001;1:156.
26. Hancock RE, Chapple DS: Peptide antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1317.
27. Hancock RE, Lehrer R: Cationic peptides: a new source of antibiotics, *Trends Biotechnol* 1998;6:82.
28. Hancock RE, Rozek A: Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides, *FEMS Microbiol Lett* 2002;206:143.
29. Jarosz J: Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects, *Cytobios* 1997;89:73.
30. Jarosz J, Glinski Z: Selective inhibition of cecropin-like activity of insect immune blood by protease from American foulbrood scales, *J Invertebr Pathol* 1990;56:143.
31. Jensen TS, Pedersen S, Garne S, Heilmann C, Hoiby N, Koch C: Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *J Antimicrob Chemother* 1987;19:831.
32. Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE: Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*, *Infect Immun* 1996;64:782.
33. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J: Novel properties of antimicrobial peptides, *Acta Biochim Pol* 2003;50:461.
34. La Rocca P, Biggin PC, Tieleman DP, Sansom MSP: Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers, *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:185.
35. Lamb HM, Wiesman LR: Pexiganan acetate, *Drugs* 1998;56:1047.
36. Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes, *Blood* 1986;68:1407.
37. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN: Bacterial phosphocholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract, *Infect Immun* 2000;68:1664.
38. MacFarlane ELA, Kwasnicka A, Hancock RE: Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides, *Microbiology* 2000;146:2543.
39. MacFarlane ELA, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock RE: PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance, *Mol Microbiol* 1999;34:305.
40. Maddox MW, Longo ML: A Monte Carlo study of peptide insertion into lipid bilayers: equilibrium conformations and insertion mechanisms, *Biophys J* 2002;82:244.
41. Madigan MT, Martinko JM, Parker J: *Biology of Microorganisms*, 8. baskı, s. 52, Prentice Hall International Inc., New Jersey, NJ (1997).
42. Matsuyama K, Natori S: Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), *J Biochem* 1990;108:128.
43. Matsuzaki K: Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:1.
44. Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N, Miyajima K: Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2, *Biochemistry* 1995;34:3423.
45. Mosca DA, Hurst MA, So W, Viajar BSC, Fujii CA, Falla TJ: IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1803.
46. Nicolas P, Vanhoye D, Amiche M: Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides, *Peptides* 2003;24:1669.
47. Nos-Barbera S, Portoles M, Morilla A, Andreu D, Paterson CA: Effect of hybrid peptides of cecropin A and mellitin in an experimental model of bacterial keratitis, *Cornea* 1997;16:101.
48. Oren Z, Shai Y: Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 1998;47:451.
49. Park CB, Kim HS, Kim SC: Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions, *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:253.
50. Patrzykat A, Zhang L, Mendoza V, Iwama GK, Hancock RE: Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1337.
51. Pellegrin P, Menard C, Mery J, Lory P, Charnet P, Benne R: Cell cycle dependent toxicity of an amphiphilic synthetic peptide, *FEBS Lett* 1997;418:101.
52. Peschel A: How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, *Trends Microbiol* 2002;10:179.
53. Peschel A, Collins LV: Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin, *Peptides* 2001;22:1651.
54. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Gotz F: Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides, *J Biol Chem* 1999;274:8405.
55. Piers KL, Brown MH, Hancock RE: Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria, *Gene* 1993;134:7.
56. Powers JP, Hancock RE: The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides* 2003;24:1681.
57. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C: Antimicrobial peptides: premises and promises, *Antimicrob Agents* 2004;24:536.

58. Resnick NM, Maloy WL, Guy HR, Zasloff M: A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure, *Cell* 1991;66:541.
59. Sawyer JG, Martin NL, Hancock RE: Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun* 1998;56:693.
60. Scocchi M, Romeo D, Cinco M: Antimicrobial activity of two bactericins against spirochetes, *Infect Immun* 1993;61:3081.
61. Scott MG, Gold MR, Hancock RE: Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and Gram-positive bacteria, *Infect Immun* 1999;67:6445.
62. Sears PM, Smith BS, Stewart WK et al: Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows, *J Dairy Sci* 1992;75:3185.
63. Shafer WM, Qu XD, Waring AJ, Lehrer RI: Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1829.
64. Shai Y, Oren Z: From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereometric cell-selective antimicrobial peptides, *Peptides* 2001;22:1629.
65. Sidorczyk Z, Zahringer U, Rietschel ET: Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* remutant, *Eur J Biochem* 1983;137:15.
66. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K et al: Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4673.
67. Steinberg DA, Hurst MA, Fuji CA et al: *Protegrin-1*: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity, *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1738.
68. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M: Epithelial antibiotic induced in states of disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8686.
69. Travis SM, Singh PK, Welsh MJ: Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface, *Curr Opin Immunol* 2001;13:89.
70. Tsang JC, Weber DA, Brown DA: Evidence for complex formation between polymyxin B and lipopolysaccharides from *Serratia marcescens*, *J Antibiot* 1976;29:735.
71. Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen O, Kramer M, Vorland LH: Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B, *J Antimicrob Chemother* 2002;50:461.
72. Velasco M, Diaz-Guerra MJ, Diaz-Achirica P, Andreu D, Rivas L, Bosca L: Macrophage triggering with cecropin A and mellitin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression, *J Immunol* 1997;158:4437.
73. Wieser LG, Hiemstra PS, Van Den Barselaar MT, Ballieux PA, Van Furth R: Role of *YadA* in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes, *Infect Immun* 1996;64:1653.
74. Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C et al: Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *J Biol Chem* 2001;276:1772.
75. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW: Barrel-stave model or toroidal model? A case study on mellitin pores, *Biophys J* 2001;81:1475.
76. Yeaman MR, Yount NY: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev* 2003;55:27.
77. Yoo YC, Watanabe R, Koike Y et al: Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species, *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:624.
78. Zasloff M: Reconstructing one of nature's designs, *TIPS* 2000;21:236.
79. Zhang L, Rozek A, Hancock RE: Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes, *J Biol Chem* 2001;276:35714.