

---

# Geniş Spektrumlu Doğal Antibiyotikler: Katyonik Peptidler

Işın AKYAR\*, Seyyal ROTA\*

\* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Son 50 yılda doğal, yarı sentetik veya sentetik antibakteriyel kimyasallar ölümcül hastalıklara karşı başarıyla kullanılmıştır. Antibiyotik devri olarak adlandırılan bu dönemin artık sonuna yaklaşmıştır<sup>[1]</sup>.

Geçtiğimiz çeyrek yüzyılda tedavi açısından kullanılan yeni antibiyotikler tanımlanamamış ve mevcut antibiyotiklere karşı direnç oranlarında artma gözlenmiştir. Ayrıca, antibiyotik ile tedavisi pek de mümkün olmayan pek çok önemli patojen suş da yeni tanımlanmıştır<sup>[2]</sup>.

Direnç gelişimini arttıran iki önemli faktör vardır: Bunlardan birincisi; mutasyonların zamanla çok fazla artması ve buna bağlı olarak antibiyotiğin etkisiz kalmasıdır. İkincisi ise, son yıllarda yeni antibiyotik sınıflarının tanımlanmamasıdır. En yeni grupta olan nalidiksik asit 30 yıl önce ortaya çıkmıştır. Üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler ve kinolonlar daha önceden bilinen antibiyotiklerin varyasyonlarıdır ve bunlara karşı antibiyotik direnci hızla artmaktadır<sup>[1]</sup>. Bu yüzden günümüzde yeni antibiyotiklerin tanımlanmasına çok fazla gereksinim vardır.

İnsanlar ve diğer canlılar sürekli olarak birçok bakteriye maruz kalırlar. İmmün yanıt eksikliğinde bile özgül olmayan savunma sistemleri sayesinde nadiren hastalanırlar. Doğal olan bu savunma sistemlerine artık yeni antimikrobiyal stratejiler gözüyle bakılmaktadır. Geçtiğimiz yüzyılda infeksiyonlara karşı birçok organizmanın majör nonspesifik savunma mekanizması olarak katyonik peptidleri kullandığı

ortaya çıkmıştır. Değişik türden yaşam şekillerinde 140'dan fazla katyonik peptid tanımlanmıştır.

Amfibiyanlarda (hem karada hem de suda yaşayabilen hayvanlarda, örneğin kurbağalarda) maganın gibi katyonik peptidler derilerinin en önemli koruma faktörüdür. Birçok patojen mikroorganizmayla karşılaşmalarına rağmen kolay kolay enfekte olmazlar. İnsanlarda olduğu gibi daha yüksek canlılarda defensinler gibi katyonik peptidler invaziv patojenlere karşı nonspesifik savunmada nötrofillerdeki majör protein türleridir. Diğer katyonik peptidler mukozal yüzeylerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadırlar: Örneğin “lingual antimikrobiyal peptid” ve “cecropin P1” mukozal immüniteye belirgin olarak katkıda bulunurlar. Katyonik peptidler aynı zamanda bakteriler, mantarlar ve kabuklu deniz hayvanları tarafından da oluşturulur. Böylece, aynı anda birçok yerde bulunabilirler<sup>[2]</sup>. İki grup peptid antibiyotik polimiksinler ve gramisidin bir süre önce keşfedilmiş ve daha çok topikal tedavide kullanılmıştır. Her ikisi de katyonik peptid olan bu ajanlar toksisite yapmaya eğilimli olduklarından her ne kadar psödomonaslara etkili olsalar da kullanımları kısıtlanmıştır. Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid antibiyotiklerin enjektabl olarak kullanılmaları bu antibiyotiklerin kullanımlarını kısıtlamaktadır.

Antibakteriyel katyonik peptidler ilaç olarak gelişmelerinin erken bir dönemindeyler. Gramisidin ve daha yeni ortaya çıkan daptomisin gibi doğal antibiyotiklerin gösterilebilen kısıtlı başarıları gelecek için umut vermektedir<sup>[1]</sup> (Tablo 1).

**Tablo 1. Bazı katyonik peptidler ve buldukları yerler**

Kaynak	Örnek	Yapı
• Memeli nötrofilleri	Defensinler	3 beta-bağı, 3 disülfid
• Amfibiyen derisi	Magaininler	Amfipatik, alfa-heliks
• Böcek lenfleri	Cecropinler	Amfipatik, alfa-heliks
• Kabuklu deniz hayvanları	Tachyplesinler	2 beta-bağı, 2 disülfid
• Bitkiler	Thioninler	3 disülfid, bilinmeyen bir yapı

### KATYONİK PEPTİDLERİN YAPISI

Katyonik peptidler, farklı moleküllerin infeksiyon etkeni mikroorganizmaları öldürebilme yeteneği elde edebilmesi için biraraya geldiğini gösteren belki de en güzel örnektir. Bu peptidlerin aralarındaki farklar da benzerlikler kadar önemlidir. Tüm katyonik peptidler 12 ve 40 aminoasit arasında sekanslardan oluşmuşlardır. Katyonik peptidlerin ayırdettirici iki özelliği vardır: Arginin ve lizin aminoasitlerini içerdikleri için en az +2 ya da genellikle olduğu gibi 4, 5, 6 kadar net pozitif yükleri vardır. Bu aminoasitler nötral pH'da pozitif yüklüdürler. Nadiren birden fazla negatif yüklü aminoasit vardır. Başka bir benzerlik de bu gibi moleküllerin uygun koşullarda üç boyutlu olmasıdır. Bir membranda hidrofobik ve hidrofilik yüzleri birarada bulunur. Yani amfipatik özellik taşır. Bu genel yapı içerisinde pek çok varyasyon bulunmaktadır. Ek olarak, lanthionine gibi pek sık rastlanmayan aminoasitler sıklıkla nisin gibi bakteriyel katyonik peptidler içerisinde bulunur. Modifiye C ve N-terminal aminoasitler aynı zamanda fazla sık olarak görülür. Daha önemlisi, disülfid bağları, alfa-helikler ve daha geniş yapıları olan beta-yapılı peptidler de içeren peptidlerin sekonder ve tersiyer yapıları değişebilir. Bu grup içerisinde moleküller benzerliklerine rağmen uzunluk, aminoasit sekansı ve sekonder yapı açısından farklılıklar göstermektedir. Yüzyükten fazla doğal katyonik peptid 11-50 aminoasit uzunluğunda ve net +2 yüke sahip olma özelliğini göstermektedir. Literatürde katyonik peptidler olarak bilinen peptidler 4 ana gruba ayrılır. Bu grupta beta-yapılı peptidler, alfa-helikal peptidler, sistein-disülfid köprüleriyle oluşturulmuş halka yapılar ve tek bir aminoasitin dominant olduğu peptidler bulunur<sup>[1,2]</sup>.

### KATYONİK PEPTİDLERİN İŞLEVLERİ ve DOĞADAN İZOLASYONLARI

Katyonik peptidler mikrobiyal infeksiyonlara karşı birçok canlının önemli savunma mekanizmalarıdır. Dil, trakea, barsaklar hasarlandığında mukozal yüzeylerde bulunurlar<sup>[3]</sup>.

Antibakteriyel peptidler ve proteinler, zehirler ve toksinler yoluyla vücuda giren mikroorganizmalara zarar verirler. Enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar ile hücre lizisine yol açarlar. Nonenzimatik protein ve peptidler şunlardır:

1. Miyotoksinler; yılan zehirinden izole edilen toksik proteinlerdir. Kas dejenerasyonuna neden olurlar.

2. Mellitinler; arı zehirinden elde edilirler. Eritrosit lizisine yol açarlar.

3. Gama-hemolizinler, vibriolizinler ve aerolizinler; mikrobiyal toksinlerden izole edilirler ve eritrosit lizisine neden olurlar.

4. Böceklerden izole edilen antibakteriyel polipeptidler (cecropinler, sarkotoksinler ve ilgili peptidler), amfibiyenlerde magaininler.

5. Diğer sitotoksinler (yılan zehirinden izole edilen kardiotoksin vs)<sup>[1,3]</sup>.

### Magaininler

Laboratuvarlarda sıkça kullanılan *Xenopus laevis* cinsi kurbağalar incelendiğinde hayvanın cildi ve karın kasları kesildiğinde bile mikrop dolu bir suda infekte olmadığı gözlenmiştir. Bu da magainin A1 ve 2 olarak adlandırılan iki peptide bağlanmıştır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin, mantarların üremesini önlerler ve protozoaların ozmotik lizisini uyandırır<sup>[4]</sup>. Anyon seçici özellikleri vardır. Mitokondride ve sitokrom oksidaz lipozomlarında membran potansiyelini düşürerek solunum kontrolünün kaybolmasına yol açarlar<sup>[5]</sup>. Yapılan bir çalışmada, magainin A2 terapötik ajan olarak tek başına çok fazla etkili değilken, düşük dozda sefepimle birlikte verildiğinde etkili bir antibakteriyel ajan olmuştur<sup>[6]</sup>. Magainin analogları *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica* ve *Trypanosoma cruzi*'ye karşı yapısal bütünlüğü ve motiliteleri açısından incelenmişler ve özellikle magainin B etkili bulunmuştur<sup>[7]</sup>. Bazı magainin analoglarının antikanser etkileri de bulunmak-

tadır. Peptid moleküllerinin membranlarda iyon geçirgen kanallar oluşturması esas mekanizmadır. Son zamanlarda meme, akciğer ve over kanserlerinin tedavisinde epipodofilotoksinler (Ub-16), vinkristin ve antrakalsilinler gibi sitolitik peptidlerin kullanılmasıyla çoklu ilaç direncinden kurtulunmuştur<sup>[8]</sup>. Güney Afrika kurbağalarının cilt salgılarında ayrıca, hormona benzer etkiler vardır. Peptid biyosentezinde, salgılama ve bunu takip eden proteolitik degradasyonda rol alırlar. Büyük, sağlam peptidler litik etki yaparlar. Oysa, daha küçük proteolitik parçalar göreceli olarak inaktiftir. Bu da kurbağanın salgılarının toksik olması beklenirken kendisine karşı nasıl zararsız kaldığını açıklamaktadır<sup>[9]</sup>.

### Mellitin

Apis mellifera denen bal arısının zehirinde bulunan mellitin 26 aminoasitten oluşmuştur. Membranlar üzerine voltajı arttırarak etkilidir. Dozuna bağlı olarak iyonik permeabilite artışından hücre lizisine dek etkileri gözlenebilir. Başka bir görüş de membran yüzeyine paralel duran polipeptidle etkileşime girip hidrofobik bir reaksiyonla membranı etkilemesidir<sup>[10]</sup>. Mellitinin membranlara etkisi birçok farklı yolla olmaktadır. Lipid kompozisyonu, peptid konsantrasyonu, pH, membran potansiyelinin varlığı veya yokluğu ve membran hidrasyon seviyesine göre bu etkileşim değişmektedir<sup>[11]</sup>. Mellitin membranlarda tetramerler halinde birikir. Birbirleriyle birleşen yapılar membrandan geçebilen hidrofilik bir por oluştururlar<sup>[12]</sup>. Mellitinin yüksek konsantrasyonlarında membranlar deterjan uygulanmış gibi olurlar; membran lipidlerinin özelliklerinde bazı değişiklikler gözlenir. Mellitinin karakteristik etkisi hemolizdir. 1 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda daha fazla mellitin eritrositlere bağlanır ve hemoglobinin hücre dışı ortama salınımını uyarır<sup>[13]</sup>.

### Cecropinler

Böceklerden izole edilen antibakteriyel polipeptidlerdir. Bakteri hücre membranları üzerine direkt etki yaparlar. Bakteriler üzerine cecropinin etkisini incelemek amacıyla sentetik cecropin analoglarıyla çalışılmıştır. Çok az antibakteriyel etkileri vardır. Bazı bakteriler cecropine dirençlidir. Cecropin benzeri bir peptid olan sarkotoksin; bakterinin sitoplazmik membranını harap ederek, aktif transport ve ATP üretimini önler<sup>[14]</sup>.

Azurofil granüllerde antibiyotik özellik gösteren proteinler bulunur: Bakterisidal permeabilite arttırıcı protein, defensinler, serpracidinler adı verilen protein ailesi.

Sığır nötrofillerinde yapılan çalışmalarda nötrofil granül ekstrelerinin belirgin aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Kromatografik yöntemle incelendiğinde iki antibakteriyel sistem bulunmuş ve bunlara bakterileri öldüren anlamına gelen "bactenecin" adı verilmiştir (bacterium ve öldürmek anlamına gelen necare kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilmiştir)<sup>[15]</sup>.

### Bactenecinler

Bazı gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerine etkilidirler. Başlıca prolin ve argininden oluşmuşlardır. Bunlar dışında, hidrofobik aminoasitler olan izolösin, lösin ve fenilalanin de içermektedirler<sup>[15,16]</sup>. Bactenecinlerin iki formu olan bactenecin (bac) 5 ve bac 7 kemik iliğinin immatür miyeloid hücrelerinde sentezlenir ve büyük granüllerde inaktif probactenecinler olarak depolanırlar. Olgun formlara duyarlı olan organizmalar üzerine in vitro olarak saflaştırılmış probactenecin formları antibiyotik aktivite göstermezler. Pro kısmının kaldırılmasıyla nötrofil uyarımı ile bakterisidal aktivite gözlenir<sup>[16]</sup>. Hem bac 5 hem de bac 7'nin *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae*'yi etkin bir şekilde öldürme gücü vardır. Fakat, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae*'ya etkileri yoktur<sup>[15]</sup>. Bac 5'in pro kısmı daha önce tanımlanmış olan kationik peptidler indolicidin ve CAP 18 ile benzerlik gösterir. Sistein proteinaz, katepsin-L'nin inhibitörü olan catheлин içerdiği için inflamatuvar bölgelerde doku hasarını önler. Böylece konak savunmasına yardımcı olur<sup>[16]</sup>.

Defensinlerle analog olmaları nedeniyle bazı bactenecinler hem antibakteriyel hem de antiviral etki gösterebilirler. Örneğin, bac 7 antibakteriyel etkisinin yanısıra antiviral etkiye de sahiptir. Herpes simpleks virüs tip-1'i nötralize edebilir. Antiviral peptid III a2 betaya benzerlik gösterir. Bac 5 ve bac 7 ayrı yapılara sahip olmalarına karşın aynı monoklonal antikorla reaksiyon verirler. Bactenecinlerin intrafagolizozomal konsantrasyonlarının yüksek olması proteazlar, düşük pH veya negatif yüklü makromoleküller gibi olası antagonistler varlığında bile etkili olmasını sağlar. Etkileri ortamın iyon içeriğiyle ters orantılıdır. Divalan katyonlarla inhibe olurlar. Yapılan çalışmalar bakteriyel canlılığın azalmasının membran permeabilitesindeki artma ve bunu takip eden solunuma bağlı proton motive edici gücün azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Hüresel metabolitler ve makromoleküler biyosentez yeteneği azalmıştır. Bac 5 ve bac 7'nin dış membranı geçiş sitoplazmik membrana ulaştıkları düşünülmektedir. Bu arada bac 5 ve bac 7 ile aynı anda dış membranı geçebilen di-

ğer polipeptidler bactenecinlerin letal etkilerini arttırmaktadırlar<sup>[1,15]</sup>.

### Defensinler

Memelilerin savunma sisteminde aktif rol oynayan nötrofillerin içerisinde (total proteinin %30-50'si) yüksek konsantrasyonda bulunan düşük molekül ağırlıklı katyonik peptidlerdir. Küçük, sisteinden zengin antimikrobiyal peptidlerdir. Hepsinde 3 disülfid bağı, 1 arginin ve 1 glisin rezidüsü bulunur. *E. coli*'yle yapılan çalışmalarda periplazmik alanda ve dış membrana tutunmuş olarak elektron yoğun depozitler halinde gözlenmişlerdir. Defensinler litik peptidlerden çok spesifik reseptör proteinlerine bağlanarak etkiyen küçük toksinlere daha çok benzerlik göstermektedir. Asetilkolin reseptörü gibi moleküllere bağlanarak etki eden birçok yılan, akrep ve örümcek toksinini andıran pozitif yük, beta yapısı, disülfid bağlarına sahip olma gibi özellikleri vardır. Yine de yapısı diğer membran permeabilize edici katyonik peptidlerden daha farklıdır<sup>[17]</sup>. Etkileri membran geçirgenliğine bağlıdır. Gram pozitif, gram negatif bakterilere karşı potent in vitro mikrobisidal aktivite gösterirler. Mantarlar, zarflı virüsler, memeli tümör hücrelerine karşı da etkilidirler<sup>[18,19]</sup>. Diğer antibakteriyel katyonik polipeptidler örneğin, insan nötrofil polipeptidleri olan bakterisidal/permeabilite artırıcı protein ve defensinler de membran permeabilitesini artırır ve gram negatif bakterilerde solunum inhibisyonu yaparlar. Bactenecinlerin tersine defensinlerin etki etmesi için aktif metabolizma halinde olması gerekmektedir. Bu olay, defensinlerin moleküler hedeflerine ulaşmaları için aktif transporta gereksinim duymalarından kaynaklanıyor olabilir. Oysa, bactenecinler dış membrana bağlandıktan sonra hedeflerine pasif difüzyonla bağlanabilmektedirler<sup>[20]</sup>.

### İnsan Nötrofil Peptidi (HNP)

Defensin peptidlerden biridir. HNP-1'in Herpes simpleks virüs-1 (HSV-1)'i inaktive ettiği gösterilmiştir. Defensin peptidlerin belli virüslere bağlanmaları virüslerin hücreleri infekte etme yeteneklerini bozabilmektedir. HNP (1,2,3) proteinleri antifungal ve antiviral özellik gösterir<sup>[21]</sup>.

### MCP-1,2

Tavşan lökositlerinde bulunan bu proteinler HSV-2, vesiküler stomatitis virüs ve influenza virüs A'ya etkilidir<sup>[22]</sup>.

### Sapecin

Sarcophaga peregrina'ya (bir tür sinek) ait bir katyonik peptiddir. İntramoleküler disülfid köprüleri olan 40 aminoasitten oluşmuştur. Gram pozitif bakterilere gram negatiflerden daha etkilidir. Esas hede-

fi, membrandaki kardiyolipine bağlanarak membran hasarı yapmaktır. Sapecin vücut travmasında larval hemolenflerde diğer sarcophaga lectin veya sarkotoksinler gibi savunma proteinleriyle birlikte bulunur. Bu yüzden sapecin aynı zamanda savunma proteini olarak böceği patojenik bakterilerden korur. Savunma ve gelişmede birbirinden bağımsız en az iki rol oynar: Bakterileri öldürür ve ontogenez sırasında hücre proliferasyonunu uyarır<sup>[23]</sup>.

Bakteriler ve mantarlar gibi basit canlılar bile bazen katyonik peptidleri selektif antibiyotikler olarak kullanırlar (bacteriocinler gibi). Katyonik peptidler bakteriden insana kadar değişen tüm yaşam şekillerinde bulunmakta olup doğanın zorlu mikroorganizmaları kontrol etmede kullandığı esas mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadırlar<sup>[1,2]</sup>.

### Üretim

Geçtiğimiz yüzyılda 20'den fazla doğal peptid antibiyotik bulunmuştur. Bunlar genellikle 15-34 aminoasit uzunluğunda en az 4 lizin veya arginin içeren, içinde oldukları organizmada veya hücre içerisinde bol miktarda bulunan peptidlerdir. Bazı spesifik dokuların içerisinde fazla miktarda katyonik peptid bulunmasına rağmen, bunları doğal kaynaklardan elde etmek pek pratik değildir. Daha sık olarak sentez için protein kimyasal yöntemleri kullanılır. Peptid sentezinin en yeni yöntemleri kullanılsa da (solüsyon-faz kimyası) peptidleri bu yolla üretmek oldukça pahalıdır ve bu olay potansiyel klinik kullanımı kısıtlayabilir. Rekombinant DNA teknolojisi ile bu olay gerçekleştirilebilir. Burada plazmidlerle kodlanan füzyon proteinlerinin parçaları olan peptidler oluşur. Bu yöntemle, herhangi bir katyonik peptid sekansını klasik bakteriyel fermantasyon yöntemini kullanarak oldukça fazla miktarda üretmek mümkündür (yaklaşık olarak bakteriyel hücre kütlelerinin %2'si)<sup>[1,2,24]</sup>.

Bunun yararlarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Sistemin sınıflandırılmasının kolaylaştırılması,
2. Uygun fiyata istenilen proteini elde edebilme,
3. Bölgesel mutagenezi kullanarak varyantlar oluşturmak ya da yeni peptidler oluşturmak ve daha sonra izolasyon prosedürlerini devreye sokmak,
4. Ağır atomları biraraya getirerek yapısal çalışmalara fırsat sağlamak.

Bir çok değişik peptid farklı biyolojik sistemlerle üretilmeye çalışılmıştır. Defensin A hayvanlarda eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır. Bakteride eksprese edilen tek antimikrobiyal peptid akrep insecto-

toksinidir. Yapılan çalışmalarda HNP-1 (insan nötrofil proteini) ve CEME (cecropin-mellitin hibridi) üretilmeye çalışılmıştır. Daha sonra saflaştırma işlemi de uygulanan bu iki peptidten HNP-1'in antibakteriyel etkisinin kalmadığı oysa, CEME'nin özel bir yöntem olan protein A füzyon protein sistemini kullanarak başarılı bir şekilde saflaştırıldığı ve etkisinin bozulmadan kaldığı gözlenmiştir. Küçük peptidlerin füzyon proteinleri olarak üretiminin bir çok avantajı vardır;

1. Dış ortama salındığında proteazlardan korunabilir. PA-CEME, PA-HNP-1 şeklinde gösterilir,
2. Füzyon amacıyla kullanılan proteinlerin çoğunun bazı moleküllere afinitesi vardır, böylece tek basamakta saflaştırılabilir,
3. Bir füzyon molekülünün varlığı antimikrobiyal peptidi konak organizmaya karşı aktif hale gelmekten korur,
4. Heterolog protein bir haptene bağlanmaya gereksinim duymaksızın antikorları ortaya çıkarabilir,
5. Füzyon partneri peptid stabilitesini göstermek için kullanılabilir,
6. Peptid taşıyıcı proteinle herhangi bir kimyasal veya spesifik proteolitik ayırımla kolaylıkla kaynaşabilir<sup>[24]</sup>.

Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş CE- ME'ye modifiye C terminali eklenmesiyle CE- ME'den iki pozitif yük fazlası olan bir analogu (CE- MA) elde edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter cloacae* üzerinde yapılan çalışmalarda bu bakterilere CEME, CEMA ve mellitin uygulanmış ve dış membran proteinlerini permeabilize etme yeteneğinin en fazla CEMA'da olduğu görülmüştür. CEMA aynı zamanda bakteriyel endotoksinlere bağlanma yeteneği en fazla olan protein olmuştur. CE- ME ile CEMA'nın MİK'leri benzese de CEMA potent LPS bağlama kapasitesi olduğu için dış membran permeabilizan etkileri fazla olan bir protein olarak göze çarpmaktadır<sup>[25]</sup>.

*Lactococcus lactis*'in doğal fermentasyon ürünü olan nisin dışında henüz büyük miktarlarda doğal kaynaklar ekonomik nedenlerden dolayı elde edilememektedir (polimiksin ve gramisidin de doğal fermentasyon ürünleridir). Kullanılan iki üretim yöntemi protein kimyası ve rekombinant DNA teknolojisidir. N ucundan C ucuna aminoasit sentezi otomatize peptid sentezi sistemiyle yapılmaktadır. Bu kimyasal sentez sisteminin maliyeti rekombinant teknoloji kullanılmasına göre daha fazladır. Füzyon protein teknolojisi ile rekombinant DNA üretimi daha uygundur ve son basamakta elde edilen diğer antibiyotiklerin kullanabileceği fermentasyon ürünüdür<sup>[1,2]</sup>.

### İN VİTRO ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTE

Kationik peptidlerin MİK değerleri diğer ticari antibiyotiklerin MİK değerlerinden çok fazla değişiklik göstermez<sup>[1]</sup>. Dirençli mikroorganizmalara karşı [örneğin; *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, metisiline dirençli stafilkokklar (MRSA), vankomisine dirençli enterokokklar, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturan *E. coli*, çoklu antibiyotiğe dirençli olan gram negatifler gibi] bakterilerde bile MİK'leri 1-8 µg/mL'dir<sup>[2,20]</sup>.

Kationik peptidlerin antimikrobiyal aktivite spektrumu geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteden, gram negatif, gram pozitif bakteriye özgü veya antifungal aktiviteye spesifik olmak üzere çok fazla değişik etki gösterir<sup>[1,3]</sup> (Tablo 2).

Birçok duyarlı mikroorganizma üzerine klasik antibiyotikler kadar potent olmasa da bu kationik peptidlerin bazı belirgin etkileri vardır: Öncelikle, MRSA, multirezistan *P. aeruginosa*, *E. cloacae* gibi hem klinik olarak antibiyotiğe dirençli suşlar, hem de antibiyotiğe duyarlı suşlara etki edebilirler. İkinci olarak, MİK değerinin yarısı konsantrasyondaki peptidi içeren vasatta multipl pasajlar sonrasında bile dirençli mutantlar ortaya çıkmaz. Üçüncü olarak MİK değerlerinde çok hızlı öldürürler. İki-yirmi dakika içe-

**Tablo 2. Bazı kationik peptidlerin MİK değerleri**

Tür	MİK (mg/L)				
	Mellitin	CEME	CEMA	Polimiksin B	Gentamisin
• <i>Escherichia coli</i>	8	2.4	2.8	0.5	1
• <i>P. aeruginosa</i>	8	2.4	2.8	0.5	1
• <i>S. typhimurium</i>	16	2.4	5.6	1	4
• <i>E. cloacae</i>	8	2.4	2.8	0.5	0.5

risinde %99.9 bakteri ölmüş olur. Oysa, birçok ticari antibiyotik MİK değerinde 60 dakika içerisinde %90'dan az bakteriyi öldürür.

Nötropenik farelerde yapılan çalışmalarda intraperitoneal *P. aeruginosa* infeksiyonlarında tek doz uygulanması halinde bile katyonik peptidlerin tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Yine farelerde yapılan çalışmalarda *Helicobacter*'e etkisi olduğu gösterilmiştir.

Divalan katyonların yüksek konsantrasyonlarında MİK'ler yükselir. Bu da bakterilerin yüzey bağlanma bölgeleriyle yarışmaya yol açabilir. Bu fenomenin açıklanması için farklı açıklamalar yapılabilir. Direkt antimikrobiyal aktiviteye ek olarak, katyonik peptidlerin bakteriler üzerine farklı iki aktivitesi vardır: Öncelikle piyasada bulunan ticari antibiyotiklerle sinerjizm göstererek "arttırıcı" etki yaparlar. Katyonik bir peptid olan magainin ile sefpirom arasında fare modelinde açık sinerjizm gösterilmiştir. Burada magainin tek başına etkisiz olduğu halde sefpirom ile sinerji gösterip etkisini arttırmıştır. İkinci olarak bazı ticari antibiyotiklerin tersine endotoksini bağlar. Ticari antibiyotiklerin bazıları bakteriden endotoksin salınımı sağlar ve endotokseminin gelişmesine yol açar. Oysa, katyonik peptidler antiendotoksik aktivite gösterir, tümör nekrotizan faktör (TNF)'ün uyarılmasından korur ve galaktozaminle duyarlanmış farelerde endotoksik şoku azaltır.

Nadir de olsa bu katyonik peptidlere karşı doğal olarak dirençli bakteriler vardır. Bunlara iki örnek olan *Burkholderia cepacia* ve *Serratia marcescens* katyonik peptidlere geçirgen olmayan bir dış membran ve spesifik proteaz üretimi ile direnç gösterirler<sup>[2]</sup>.

### İN VİVO AKTİVİTE

Katyonik peptidlerin in vivo etkinlikleriyle ilgili çok az yayın vardır. Darveau ve arkadaşları magaininlerle sefpirom arasında bir sinerjizm bulunduğunu göstermişlerdir. Lipopeptid kolistin (polimiksin B)'nin birçok infeksiyonda etkili olduğu gösterilirken, polimiksin B ile ilişkili peptid hayvanları endotoksinin toksik etkilerinden korur. Alfa-helikol katyonik peptidler olan MBI-27 ve MBI-28 *P. aeruginosa*'nın peritoneal infeksiyonlarından ve endotoksemiden korunmayı fare modellerinde sağlamışlardır. Ahmad ve arkadaşları lipozomal indolicidin'in kobayları sistematik fungal infeksiyonlardan koruduğunu göstermiştir. Bu bileşimleri ticari hale dönüştürme çabaları sürmektedir. Nisinin *Helicobacter pylori*'de etkin olduğu gösterilmiştir. PG-1 ve Xoma gibi ilaçlar *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus*'da etkili bulunmuşlardır<sup>[1]</sup>.

### DİĞER AKTİVİTELERİ

Bazı katyonik peptidlerin farklı aktiviteleri vardır. Patojenik protozoaya, zarflı virüslere karşı aktivite, antikanser aktivite, antiproteaz aktivite, böceklerin gelişiminde rol almak ve hasarlı dokuların rejenerasyonuna yardımcı olmak bunlardan birkaçıdır<sup>[7,8,21,23]</sup>.

### MEKANİZMA

Katyonik peptidlerin etkinlik ve seçici olma özelliği onların hücre membranlarıyla olan ilişkilerine bağlıdır. Katyonik peptidler gram negatif bakterilerin hücre yüzeyinde bulunan LPS ile etkileşir ve bunu takiben kendiliğinden hücre içine girer. Bu yolda ilk adım katyonik peptidler veya aminoglikozidler gibi polikasyonların hücre yüzeyinde LPS üzerinde dival katyon bağlama bölgeleri ile etkileşimdir<sup>[11]</sup>. Ca ve Mg gibi doğal dival katyonların yerini kompetitif olarak aldığı için dış membranın doğal engelini bozarlar. Etkilenmiş membran geçici olarak hidrofobik bileşikler, küçük proteinler ve/veya antimikrobiyal bileşikler ve daha da önemlisi peptidin kendisinin geçişine izin veren çatlaklar oluşturur. Bu mekanizma ile katyonik peptidlerin nasıl endotoksinlere bağlanıp inhibe ettikleri ve ticari antibiyotiklerle nasıl sinerji gösterdikleri açıklanabilir. Farklı peptidler kendiliğinden geçiş gösteren substrat olarak etkinliklerinde çok farklılıklar gösterebilirler<sup>[1]</sup>. Yapılan çalışmalar gramisidin S gibi birçok katyonik peptidin daha çok gram negatif bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir. İndolicidin gibi dış membran proteininden alımı hız-kısıtlayıcı olan belli peptidler için dış membran etkileşimi ve MİK arasında bir etkinlik sabitesi ilişkisi bulunmuştur. Bu etkileşimin gücü aynı zamanda katyonik peptidin antiendotoksin veya arttırıcı ajan olarak ne kadar güçlü olduğunu belirler<sup>[20]</sup>.

Katyonik peptidlerle bakteri ölümünün esas mekanizması, hedef bakterinin sitoplazmik zarlarında kanallar açılmasıyla ilişkilidir. Tipik olarak peptidlerin pozitif yüklü kısımları membranların negatif yükleriyle etkileşir. Bakteriyel sitoplazmik membranının büyük elektrik potansiyeli sonucunda peptidler belirli yapılara dönüşürler. Daha sonra hidrofobik yüzleri iç membrana dönük olacak şekilde birleşip kümeler oluştururlar. Bu şekilde bir kanal oluştururlar. Model zar çalışmaları bu kanalların iki tip olduğunu göstermiştir. Farklı kanallarda değişik sayıda peptid yer alır ve bireysel kanallar oluştururlar (daha fazla alt ünite büyük kanal oluşumunu sağlar). Enerji açısından bazı düzenlemeler olur. Örneğin cecropinle kanal oluşumu için iki molekül modeli Durell ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur. Bunlar yıldız şeklinde veya

yuvarlak içinde altı dimerin düzenlenip kanal büyüklüklerinin ayarlanması ile olur. Bu olay, Christensen ve arkadaşları tarafından da gözlemlenmiş olan deneysel iletim artışına yol açar. Kanal oluşumu ile membran bütünlüğü bozulur ve hücreden ana kimyasal maddelerin ve iyonların sızması sonucu bakteri hücreleri ölürler. Kanal oluşumunun bazı özellikleri peptid seçiciliği için baz oluşturur, kanal oluşumunda -80 mV'un üzerinde yüksek transmembran potansiyeline gereksinim vardır. Bu olay zarlarda kolesterol varlığında inhibe olur. Böylece kolesterol içermeyen bakteriyel stoplazmik membranlar ve yüksek transmembran elektriksel potansiyeli peptidlerin membrana girişini ideal bir hale getirir. Oysa, -15 mV veya o civarda düşük elektriksel gradyente sahip ökaryotik hücreler ve kolesterol içerenler uygun değildir<sup>[2]</sup>.

Yukarıda sayılan mekanizmalar hem gram pozitif, hem de gram negatif bakterilerde olabilir. Ancak, gram negatif bakterilerde dış membranla etkileşim gibi ek bir etkileşime gereksinim vardır. Katyonik peptidlerin dış membrandan geçişleri herhangi bir mekanizmaya bağlı olmayıp kendiliğinden oluşmaktadır. Bu yöntemle kationik peptidler yüzey lipopolisakaritlerinin üzerinde katyon bağlayan bölgelerle fiziksel olarak etkileşir ve divalant katyonlardan daha fazla hacimleri olduğu için yer değiştirirler<sup>[9,18,20]</sup>.

### ANTI-ENDOTOKSİN ETKİNLİKLERİ

Birçok antibiyotik hücrenin öldürülmesi veya lizi sırasında LPS salınımına yol açarak endotoksine miye zemin hazırlar. Bunun tam tersi bazı kationik peptidler LPS'leri nötralize eder ve endotoksinemiden korunmayı sağlar. Örneğin alfa-helikallik peptid olan MBI-28 intraperitoneal 8 mg/kg dozunda verildiğinde farelerin %78'ini letal endotoksinemiden korumuştur. Koruyucu mekanizma LPS'lerin TNF'yi uyaramadığı bir şekilde bağlanmasıyla olmaktadır. Tüm kationik peptidlerde olmayan bu özellik antibakteriyel ajan olma yolundakiler için bir avantajdır. Katyonik peptidlerin diğer özellikleri arasında antikanser aktivite, reepitelizasyon, antiviral aktivite bulunmaktadır<sup>[3]</sup>.

### KLİNİK ÖZELLİKLER

Klinik kullanıma sunulan her antibiyotik etkinliğinin yanısıra; formülasyon, toksisite ve stabilite gibi 3 ana sorunla karşı karşıyadır. Bugüne kadar bu peptidler sadece topikal olarak denenmiştir. Bu tip kullanım kationik peptidlerin antibiyotik etki güçlerini etkilemiyor görünmektedir. Gramisidin S ve polimiksin B gibi toksik özelliği olan ilaçlar daha çok topikal formda kullanılmaktadırlar. Sistemik ve organa spe-

sifik tedavide kullanılması daha ilginç olacaktır. Aerosol tedavisi halen polikationik trisakkarit yapısında olan gentamisin, tobramisin ve polikationik lipopeptid kolistin olarak kistik fibrozisli hastalardaki *P. aeruginosa* infeksiyonlarında kullanılmaktadır. Katyonik peptidlerin de bu amaçla kullanılmaları akciğer sorunlu hastaların özellikle dirençli mikroorganizmalarla infeksiyonlarında yararlı olacaktır. Bu antibiyotikler genellikle lipozomal formülasyonla verilmektedir, uzun dönemde çok az toksisite gösterip anlamlı etkinlik sağlamaktadırlar. Oral yoldan tedavi gastrointestinal sistem hastalıklarında mümkün olabilir. *H. pylori* infeksiyonları için nisin bu yolla denenmektedir<sup>[1]</sup>.

Formülasyon açısından çok fazla şey bilinmemektedir. Bazı hayvan deneylerinde kationik peptidler serum fizyolojik içerisinde verilmiştir. Alternatif bir yaklaşım, lipozomal bir formülasyondur, bu yolla indolicidin adlı peptidin in vivo biyoyararlılığı ve aktivitesi artmıştır.

Toksisite önemli bir sorundur. Arı zehirinin esas toksik komponenti olan mellitin gibi potent toksin olduğu bilinen bazı kationik peptidler vardır. Ancak yapılan çalışmalarda makrofaj doku kültür hücrelerinde ve hayvan deneylerinde yüksek dozda bile toksisite gözlenmemiştir. Proteazların vücutta bol miktarda bulunmasından dolayı stabilite majör bir sorundur<sup>[2]</sup>.

Kasyonik peptidler belirttiğimiz gibi şu anda klinikte daha çok topikal tedavide denenmektedir. Ancak, bu onlara olan gerçek ihtiyacı karşılayacak ve kationik peptidlerin gerçek gücünü gösterecek düzeyde değildir. Topikal tedavide başarılı olunması parenteral tedavinin başarısı açısından iyi bir indikatör değildir. Yapılan çalışmalardan bazılarında kationik peptidlerin özellikle dirençli mikroorganizmaların tedavisinde kullanılabileceğine dair umut verici gelişmeler vardır<sup>[15,24]</sup>.

Bütün olumsuzluklara rağmen, kationik peptidlerin önümüzdeki 25 yıl içerisinde klinik ajanlar arasında yerlerini alacakları ve gerçek potansiyellerini gösterecekleri düşünülmektedir<sup>[1,25]</sup>.

### KAYNAKLAR

1. Hancock REW. Peptide antibiotics. Lancet 1997;349: 418-22.
2. Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptides: Broad spectrum antibiotics from nature. Clin Microbiol Infect 1996;1(4):226-9.
3. Kini RM, Evans H. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. Int J Peptide Protein Res 1989;34:277-86.

4. Chen HC, Brown JH, Morell JL, et al. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. FEBS Lett 1988;236(2):462-6.
5. Juretic D, Chen HC, Brown JH, et al. Magainin 2 amide and analogues- Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. FEBS Lett 1989;249(2):219-23.
6. Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, et al.  $\beta$ -lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1991;35(6):1153-9.
7. Huang CM, Chen HC, Zierdt CH. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. Antimicrob Agents Chemother 1990;34(9):1824-6.
8. Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, et al. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. Cancer Res 1993;53:3052-7.
9. Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, et al. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. Biochem J 1987;243:113-20.
10. Bazzo R, Tappin MJ. The structure of mellitin. Eur J Biochem 1988;173:139-46.
11. Dempsey CE. The actions of mellitin on membranes. Biochimica et Biophysica Acta 1990;1031:143-61.
12. Vogel H, Jahng F. The structure of mellitin in membranes. Biophys J 1986;50:573-82.
13. David SA, Mathan VI, Balaram P. Interaction of mellitin with endotoxic lipid A. Biochimica et Biophysica Acta 1992;1123:269-74.
14. Steiner H, Andreu, Merrifield R B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: Antibacterial peptides from insects. Biochimica et Biophysica Acta 1988;939:260-6.
15. Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. Purification, composition and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. Infect Immun 1989;57(10):3142-6.
16. Zanetti M, Del Sal G, Storici P, et al. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac 5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. J Biol Chem 1993;268(1):522-6.
17. Hill CP, Yee J, Selsted ME, et al. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer. Mechanism of membrane permeabilization. Science 1991;251:1481-5.
18. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*-Mechanism of bactericidal activity. J Clin Invest 1989;84:553-61.
19. Zhang XL, Selsted ME, Pardi A. NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 1. Resonance assignment and secondary structure determination of rabbit NP-2 and human HNP-1. Biochemistry 1992;31:11348-56.
20. Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram negative bacteria by bactenecins. Infect Immun 1990;58(11):3724-30.
21. Daher K, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. J Virol 1986;60(3):1068-74.
22. Lehrer RI, Daher K, Ganz T, et al. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. J Virol 1985;54(2):467-72.
23. Komano H, Homma K, Natori S. Involvement of sapecin in embryonic cell proliferation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). FEBS Lett 1991;289(2):167-70.
24. Piers KL, Brown MH, Hancock REW. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. Gene 1993;134:7-13.
25. Piers KL, Brown MH, Hancock REW. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by c-terminal modification. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(10):2311-6.

#### Yazışma Adresi:

Dr. Işın AKYAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 11.06.1998

Kabul Tarihi 05.12.1998